

Efecto de diferentes tipos de alteraciones sobre la estabilidad de los licores de crema

Universitat Politècnica de Catalunya BarcelonaTECH
Grau en Enginyeria Alimentària



Autor: **Sílvia Moya Izquierdo**

Tutora: **Montserrat Pujolà Cunill**

Castelldefels, Diciembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que han colaborado y ayudado en la realización de este trabajo. Sin ellos esto no hubiera sido posible.

Primero de todo me gustaría agradecer a la empresa Dallant, SA por darme la oportunidad de realizar el trabajo con ellos y en especial a Albert Guevara y a Rosalía Saubí por todo el tiempo que me han dedicado. Por supuesto no me olvido del resto de compañeros del departamento de Control de Calidad: Mari, Jordi, Manel, Anna, Carla, Alfons y Teresa que me han ayudado ante cualquier duda.

Agradecer también a mi tutora Montserrat Pujolà Cunill por el interés y la dedicación durante todo el trabajo.

Por último, agradecer a compañeros, amigos y familiares por el apoyo y los ánimos recibidos.

RESUMEN

Los licores de crema son bebidas alcohólicas relativamente nuevas, cuyos principales ingredientes son grasa láctea, aguardiente, caseinato sódico y azúcar, incluyendo a su vez emulsionantes, aromatizantes y colorantes. El principal ingrediente es la base láctea (emulsión o/w) que debido a la naturaleza de sus componentes hace que estos licores sean una de las bebidas alcohólicas con más problemas a nivel de estabilidad.

El objetivo de este proyecto es estudiar el efecto de distintas alteraciones (físicas, químicas o microbiológicas) en dos licores de crema realizados con una base láctea a partir de nata (SLV2) o a partir de grasa de coco (SLV6), mediante la evaluación de diferentes parámetros físicos, químicos, microbiológicos a tiempo 0 y durante un período de dos meses. Las bebidas se conservaron a temperatura ambiente (aprox 20°C) y a 35°C para acelerar los procesos y simular un envejecimiento equivalente a 8 meses de vida comercial.

Los resultados obtenidos nos indican que las alteraciones causadas por agitación excesiva durante el proceso, el uso de agua de red con elevado contenido de calcio (30°F de dureza) y la contaminación por *Pseudomona fluorescens* no comportan ninguna modificación a tiempo 0. Las bebidas alteradas a causa de un aumento de temperatura (85°C durante 15 minutos) o con una modificación de pH (pH= 10) sufren una alteración parcial, debido a reacciones de Maillard que dan como resultado un ligero cambio de color. La adición de los componentes en diferente orden al establecido y el aumento del grado alcohólico hasta 20° comportan la formación de cristales de grasa debido a la coalescencia parcial y a un aumento del tamaño de partícula en la bebida con base láctea a partir de grasa de coco (SLV6). En la bebida de base láctea a partir de nata (SLV2) la afectación es casi imperceptible. La modificación a pH 6 y la adición de un exceso de Ca^{2+} durante el proceso producen la formación inmediata de grandes agregados, aumento del tamaño de partícula y la separación de la emulsión en dos fases, viéndose más afectada la bebida SLV2 que la SLV6. La adición de espesantes (genupectin) afecta por igual a las dos bebidas ensayadas y provoca la separación de fases debido a la diferencia de densidades. Durante el período de dos meses a temperatura ambiente y a 35°C se produce en general, una ligera disminución del pH y un desnatado en casi todas las bebidas alteradas, atribuible a una homogeneización deficiente.

De acuerdo con los resultados comentados, se puede concluir que la bebida de base de nata (SLV2) es menos resistente a las alteraciones en las cuales se ven afectadas las cargas del emulgente (caseinato sódico) y la bebida de base de grasa de coco (SLV6) resulta más sensible a alteraciones relacionadas con la adición de alcohol, siendo ambas bebidas estables a las alteraciones microbiológicas por su elevado grado alcohólico (15%).

Palabras clave: licor de crema, base láctea de nata, base láctea de grasa de coco, alteraciones.

RESUM

Els licors de crema són begudes alcohòliques relativament noves. Els seus ingredients principals són greix làctic, aiguardent, caseïnat sòdic i sucre, a més a més d'emulsionants, aromatitzants i colorants. El ingredient majoritari és la base làctia, (emulsió o/w) que degut a la naturalesa dels seus components fa que aquests licors siguin una de les begudes alcohòliques amb més problemes a nivell d'estabilitat.

L'objectiu d'aquest projecte és estudiar l'efecte de diferents alteracions (físiques, químiques o microbiològiques) en dos licors de crema realitzats amb una base làctia a partir de nata (SLV2) o a partir de greix de coco (SLV6), a través de l'avaluació de diferents paràmetres físics, químics i microbiològics a temps 0 i durant un període de dos mesos. Les begudes es conservaran a temperatura ambient (aprox 20°C) i a 35°C per accelerar els processos i simular un envelliment equivalent a 8 mesos de vida comercial.

Els resultats obtinguts ens indiquen que les alteracions causades per agitació excessiva durant el procés, l'ús d'aigua de la xarxa amb un alt contingut de calci (30°F de duresa) i la contaminació per *Pseudomona fluorescens* no comporten cap modificació a temps 0. Les begudes alterades a causa d'un augment de temperatura (85°C durant 15 minuts) o amb una modificació de pH (pH=10) pateixen una alteració parcial, degut a reaccions de Maillard que donen com a resultat un lleuger canvi de color. L'adició dels components en diferent ordre a l'establert i l'augment del grau alcohòlic fins a 20º comporta la formació de cristalls de greix degut a la coalescència parcial i a un augment de la grandària de partícula en la beguda amb base làctia a partir de greix de coco (SLV6). En la beguda de base làctia a partir de nata (SLV2) l'afectació és casi imperceptible. La modificació a pH 6 i l'adició d'un excés de Ca^{2+} durant el procés produeixen la formació immediata de grans agregats, augment de la grandària de partícula i la separació de l'emulsió en dues fases veient-se més afectada la beguda SLV2 que la SLV6. L'adició d'espessants (genupectin) afecta per igual a les dues begudes assajades i provoca la separació de fases degut a la diferencia de densitats. Durant el període de dos mesos a temperatura ambient i a 35°C es produeix en general, una lleugera disminució del pH i un desnatat a gairebé totes les begudes alterades, atribuïble a una homogeneïtzació deficient. D'acord amb els resultats comentats, es pot concloure que la beguda de base de nata (SLV2) és menys resistent a les alteracions relacionades amb les càrregues de l'emulgent (caseïnat sòdic) i la beguda de base de greix de coco (SLV6) resulta més sensible a alteracions relacionades amb l'adició d'alcohol, sent ambdues begudes estables a les alteracions microbiològiques pel seu elevat grau alcohòlic (15%).

Paraules clau: licor de crema, base làctia de nata, base làctia de greix de coco, alteracions.

ABSTRACT

The cream liqueurs are relatively new alcoholic beverages, whose main ingredients are milk fat, firewater, sodium caseinate and sugar, including emulsifiers, flavourings and colourings. The main ingredient is milk-based, an emulsion o/w due to the nature of its components makes it one of the alcoholic beverage with more stability problems.

The objective of this project is to study the effect of different alterations (physical, chemical or microbiological) in two cream liqueurs with a milk-based made from cream milk (SLV2) or from coconut fat (SLV6), by an analytical study physical, chemical and microbiological at time 0 and for a period of two months. The beverages are stored at room temperature (approx 20°C) and at 35 °C to accelerate the process and simulate an aging equivalent to 8 months of shelf life.

The results indicate that the alterations caused by violent agitation, tap water with a high content of calcium (30°F of hardness) and *Pseudomonas fluorescens* contamination not involve any modification at time 0. Altered beverages with a temperature increase (85°C during 15 minutes) or with a pH modification (pH=10) suffering from a partial alteration, due to Maillard reactions that results in a slight colour change. The addition of the components in a different order to set and increased the alcoholic strength until the 20ABV involve the formation of fat crystals due to partial coalescence and increased particle size in the beverage milk-based from coconut fat (SLV6). In the milk-based beverage from cream (SVL2) the effect is almost imperceptible. The modification to pH 6 and the addition of Ca^{2+} ions cause the immediate formation of large aggregates, increased particle size and the separation of the emulsion into two phases, looking more affected the SLV6 beverage than SLV2. Adding thickeners (genupectin) equally affects both beverages and causes phase separation due to the density difference. During the period of two months at room temperature and at 35°C there is a slight decrease in pH and skimmed in most of beverages due to poor homogenization.

According to the results, we can conclude that the cream-based beverage (SLV2) is less resistant to alterations related with the electric charges of the emulsifier (sodium caseinate) and the coconut fat-based beverage (SLV6) is more sensitive to alterations related with the alcohol addition, being both beverages stable to microbiological alterations because their high alcohol content (15%).

Keywords: cream liqueur, milk-based of cream, milk-based of fat coconut, alterations.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS	1
1.1.1. Situación del sector de "Otras Bebidas Alcohólicas"	2
1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BASES LÁCTEAS.....	5
1.2.1. Proceso de elaboración de una base láctea	6
1.3. BEBIDAS ALCOHÓLICAS CON BASE LÁCTEA.....	8
1.3.1. Proceso de elaboración de un licor de crema	10
1.3.2. Características tecnológicas.....	11
1.3.3. Importancia del proceso de emulsificación en los licores de crema	12
1.3.3.1. Características generales de las emulsiones	12
1.3.3.2. Características de la emulsión de Licor de crema	13
1.3.3.3. Factores desestabilizantes de la emulsión en un Licor de Crema.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MATERIALES UTILIZADOS EN ESTE ENSAYO	20
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS: PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	23
3.3.1. Determinación del pH.....	23
3.3.2. Determinación de la viscosidad.....	23
3.3.3. Determinación del contenido en alcohol.....	23
3.3.4. Determinación del contenido en N-Amínico.....	24
3.3.5. Determinación de la densidad.....	24
3.3.6. Determinación de la distribución de partículas.....	24
3.3.7. Determinación del sedimento de centrifugación.....	25
3.3.8. Determinación del contenido en grasa.....	25
3.3.9. Determinación de los ácidos orgánicos por HPLC: cromatografía de partición en fase reversa	26
3.3.10. Determinación de los azúcares por HPLC: cromatografía de partición en fase reversa a gradiente por ELSD	27
3.3.11. Determinación de los iones Na, K, Ca, Mg: HPLC de intercambio iónico.....	28
3.4. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS.....	29
3.4.1. Recuento total de bacterias aerobias mesófilas, psicrófilas y mohos y levaduras.	29
3.4.2. Inoculación de una levadura	29
3.4.3. Identificación de la levadura	30
3.4.4. Inoculación de una Pseudomona.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33

4.1.	EFFECTOS DE LAS ALTERACIONES FÍSICAS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS CON BASE LÁCTEA	33
4.1.1.	<i>Efecto de la temperatura</i>	33
4.1.2.	<i>Efecto de la Agitación</i>	34
4.1.3.	<i>Cambio de orden en la adición de los componentes</i>	35
4.2.	EFFECTOS DE LAS ALTERACIONES QUÍMICAS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS CON BASE LÁCTEA.....	39
4.2.1.	<i>Modificación del pH</i>	39
4.2.2.	<i>Aumento del Grado Alcohólico a 20º</i>	43
4.2.3.	<i>Alteración por adición de un exceso de iones Ca^{2+} por el uso de aguas duras</i>	45
4.2.4.	<i>Adición de espesantes</i>	47
4.3.	EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS EN BASE LÁCTEA	49
4.3.1.	<i>Contaminación por levaduras, bacterias Psicrófilas o agua alterada</i>	49
4.4.	TABLA RESUMEN DE LOS EFECTOS DE LAS ALTERACIONES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS PRODUCIDAS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS CON BASE LÁCTEA	50
5.	CONCLUSIONES	53
6.	BIBLIOGRAFIA	54
7.	ANEJOS	57
7.1.	PERFILES DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LAS BASES	57
7.2.	CARACTERÍSTICAS DEL AGUA DE RED Y DEL AGUA DE OSMOSIS.	59
7.3.	FICHA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA LEVADURA IDENTIFICADA.....	60

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las bebidas espirituosas

Se considera bebidas espirituosas a aquellas bebidas con contenido alcohólico procedentes de la destilación de materias primas agrícolas (uva, cereales, frutos secos, remolacha, caña, fruta, etc.). Como por ejemplo el brandy, el whisky, el ron, la ginebra, el vodka o los licores, entre otros (<http://www.febe.es/contenidos/bebidas/>).

El Reglamento CE 110/2008 (art. 2), define las bebidas espirituosas como “la bebida alcohólica destinada al consumo humano, con cualidades organolépticas particulares, con una graduación mínima de 15% (V/V), obtenida por destilación, en presencia o no de aromas, de productos naturales fermentados, o por maceración de sustancias vegetales, con adición o no de aromas, azúcares, otros edulcorantes, u otros productos agrícolas”.

Las bebidas espirituosas o destiladas se pueden clasificar en dos tipos de destilados: los **congenéricos** y los **no congenéricos** (Figura 1). Los destilados congenéricos se caracterizan por contener componentes biológicamente activos como por ejemplo los polifenoles, y otros alcoholes, como el metanol, e la histamina que se producen junto con el etanol durante la fermentación o en el proceso de envejecimiento de la bebida. Estos congéneres varían según el origen de los azúcares fermentados (mosto, remolacha azucarera, restos agrícolas, caña de azúcar, cereales...) y la actividad biológica de las levaduras cuya presencia es la que confiere a la bebida sus características organolépticas.

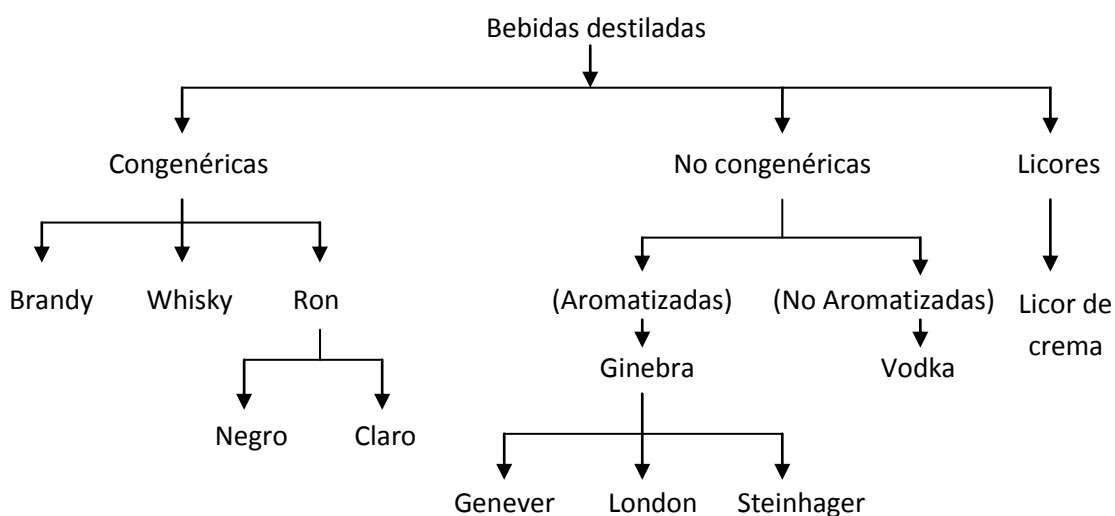


Figura 1 Clasificación de las bebidas destiladas. Fuente: Adaptado de (Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. 1996).

Las bebidas destiladas congenéricas tienen aroma propio y tenemos como ejemplo el **whisky**, el **ron** y el **brandy**. Las materias primas con la que se elaboran son tradicionales y las condiciones de fermentación y destilación están determinadas. El whisky se obtiene de la destilación de una infusión de cebada malteada y de otros cereales que ha sido previamente fermentada con *Saccharomyces cerevisiae*, la base del ron es el azúcar de caña y el brandy se obtiene por destilación del vino. Las bebidas no congenéricas incluyen el **vodka** y la **ginebra** donde la materia prima es una solución alcohólica que se puede obtener de cualquier fuente y no requieren congéneres. Para su obtención normalmente se usan cereales (trigo y maíz) o patatas, pero varía en función del país, según la disponibilidad de la materia prima y de la economía global de la región. En el caso de la ginebra, el destilado se aromatiza con enebro y con otros agentes aromáticos de origen vegetal, mientras que en el vodka el aroma se modifica mediante una filtración a través de carbón vegetal (Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. 1996).

Dentro del grupo que engloba “Bebidas espirituosas” también debemos considerar el subgrupo de los licores, que podemos definir como: destilados alcohólicos endulzados y aromatizados con sustancias de sabores compatibles y a los cuales se les puede añadir colorante. La elaboración de los licores tradicionales se realiza mezclando el destilado con un jarabe de azúcar que contiene esencias o hierbas en pequeñas cantidades. Los **licores** son más difíciles de clasificar ya que hay algunos que tanto pueden ser congenéricos, como no congenéricos y aparte existe otro grupo totalmente diferenciado conocido como **licores de crema** (licores de base láctea).

1.1.1. Situación del sector de “Otras Bebidas Alcohólicas”

El sector “Otras Bebidas Alcohólicas” incluye todas las bebidas alcohólicas excepto el vino. En **España**, la Industria de productos de alimentación y bebidas, representa el 19,66% de las ventas netas de producto, el 17,48% de personas ocupadas, el 16,96% de las inversiones en activos materiales y el 15,29% del valor añadido (encuesta INE, a 31 de diciembre de 2011). Del total de ventas netas de la Industria Alimentaria durante 2011, 3.844,25 millones de € (4,34%) corresponden al subsector “Otras Bebidas alcohólicas” que ocupa la onceava posición (Gráfico 1).

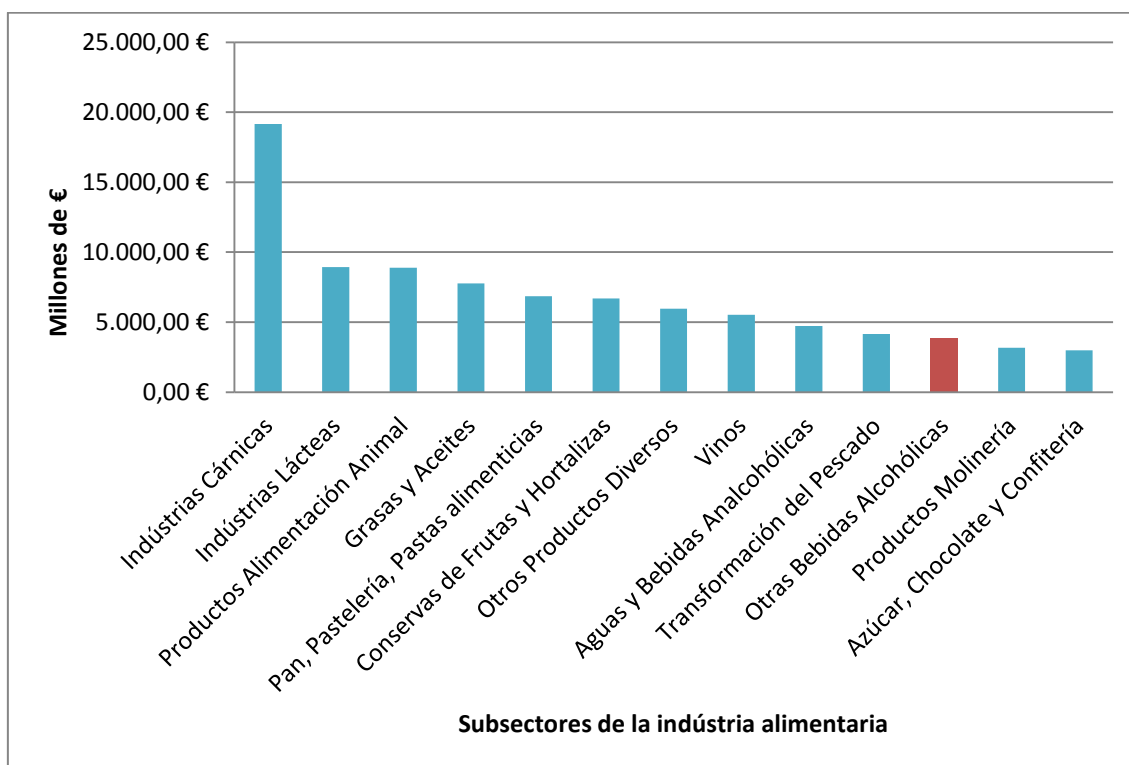


Gráfico 1 Ventas netas de la industria alimentaria por subsectores el año 2011 en España. Fuente: MARM 2011.

En el subsector “Otras Bebidas Alcohólicas” las importaciones representan casi el doble que las exportaciones, aunque en el último año las exportaciones han aumentado más que las

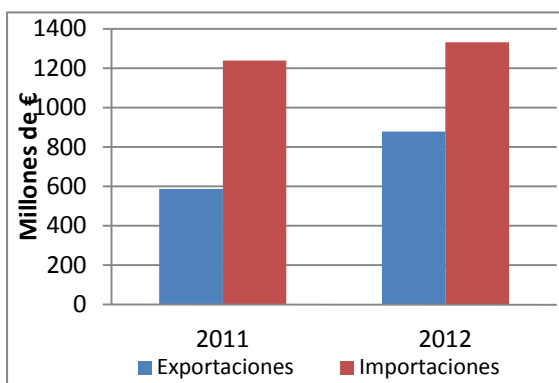


Gráfico 2 Comercio exterior “Otras Bebidas Alcohólicas” en España en 2012. Fuente: MARM

importaciones (Gráfico 2).

Para Catalunya “Otras bebidas alcohólicas” representa un 5,15% del total de ventas netas de la industria alimentaria. En este sector, al igual que ocurre con los demás, se ha visto afectado por la crisis, lo que ha comportado una evolución económica negativa en los últimos años (Tabla 1).

Tabla 1 Evolución de las magnitudes económicas de "Otras Bebidas Alcohólicas en Cataluña (miles €).

Principales magnitudes	2009	2008	09/08 (%)
Ingresos de explotación	1.328.883	1.512.795	-12,2
Ventas netas	951.833	1.074.618	-11,4
Personas ocupadas	2.166	3.113	-30,4
Número de establecimientos	40		2,6
Compras netas de materias primeras	311.394	277.079	12,4
Gastos de personal	134.668	176.466	-23,7
Valor añadido bruto	394.481	371.952	6,1

Fuente: IDESCAT 2009

Las producciones más importantes dentro del subsector "otras Bebidas alcohólicas" son las de vermut, brandi, licores y otras bebidas alcohólicas. La producción de **licores** y otras bebidas alcohólicas fue de 69.126 hl en el año 2009 lo que supuso un incremento del 12,2% respecto el año 2008 (Tabla 2).

Tabla 2 Evolución de las producciones de otras bebidas alcohólicas en Cataluña.

Producto	2009	2008	09/08 (%)
Brandi y similares	76.062	73.872	3
Whisky	24.865	19.161	29,8
Ron y similares	28.518	24.372	17
Ginebra y similares	10.699	11.849	-9,7
Vodka	11.171	9.154	22
Aguardientes de frutas	2.292	2.233	2,6
Licores y otras bebidas alcohólicas	69.126	61.607	12,2
Vermuts y otros vinos de uva fresca con aromatizantes (hl)	393.327	400.071	-1,7
Posos y desechos de cervecería y destilería (t)	83.359	104.621	-20,3

Fuente: IDESCAT 2009

1.2. Características generales de las bases lácteas

Las bases lácteas alcohólicas concentradas son el núcleo principal y fundamental para la elaboración posterior de los licores cremosos. Se preparan a partir de una grasa animal (nata) o de grasas vegetales a las que se añaden azúcares, alcohol, dextrinas, emulgentes (caseinato sódico) y estabilizantes (hexametáfosfato sódico y citrato sódico).

Son por tanto bases ricas en grasa, con contenidos elevados de sacarosa y presencia de proteínas, pudiendo considerarse cómo preparado alimenticio intermedio para uso industrial para la elaboración de licores tipo crema.

Tecnológicamente la basa láctea es una emulsión entre una fase grasa y una fase agua que contiene el soporte para su dispersión (Dextrinas), un emulgente que facilita la estabilidad de las dos fases y unos estabilizantes iónicos y de pH que mantienen el equilibrio del conjunto de la base.

Son mezclas extremadamente delicadas en cuanto al equilibrio de todos sus componentes, debiendo tomar medidas en el momento de su fabricación para evitar que pueda verse alterada su estructura por motivos mecánicos, alteraciones de pH, concentración de iones calcio, etc.

1.2.1. Proceso de elaboración de una base láctea

En la Figura 2 se presenta el diagrama del proceso de elaboración de la base láctea de nata.

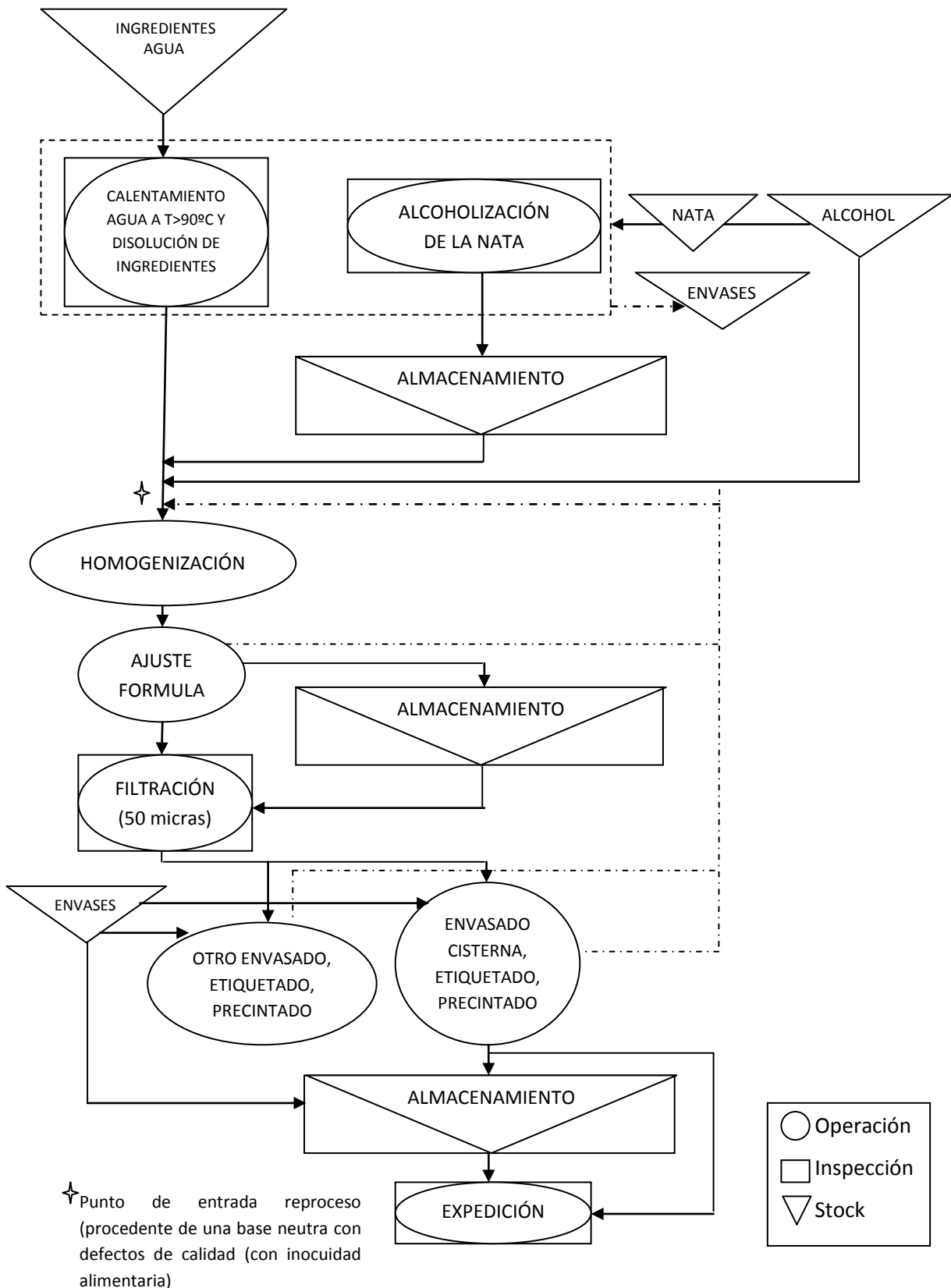


Figura 2 Esquema del proceso de elaboración de una base láctea. Adaptación del documento facilitado por la empresa Dallant, SA.

La elaboración de las bases lácteas comporta:

Alcoholización de la nata: inmediatamente después de la recepción de la nata y de realizar los controles necesarios para asegurar su calidad y seguridad alimentaria, ésta se alcoholiza para evitar el crecimiento microbiológico y así, alargar su vida útil.

Disolución de ingredientes: se calienta agua a 90-95°C mediante un intercambiador y se incorpora el citrato sódico, el hexametáfosfato sódico y el caseinato sódico mediante una mezcladora sólido-líquido. Se mezcla durante 15 minutos y se añade la dextrina y el azúcar. A continuación se añade el núcleo de nata alcoholizado y el alcohol etílico procurando mantener una temperatura entre 43-45°C y recirculando el mezclador durante la adición de estos.

Homogeneización: reducción del tamaño de los glóbulos grasos de fase dispersa para conseguir la formación de una emulsión más estable. Antes de homogeneizar se calentará la mezcla a 50-55°C mediante intercambiador de placas y se comprobarán las presiones de homogeneización.

Ajuste de fórmula: una vez terminada la base el laboratorio de Control de Calidad comprobará el alcohol y la dispersión del tamaño de partícula y realizará los ajustes de fórmula necesarios para que se adapte a las especificaciones del producto. En el caso que sea necesario un ajuste con alcohol se procederá a una nueva homogeneización.

Filtración (50 micras): es un punto crítico de control dónde se comprueba que no haya precipitado la caseína. En el caso que aparezcan grumos en el filtro habrá que comprobar el grado de afectación de esta alteración.

El proceso de elaboración de la base con **grasa de coco** sigue el mismo esquema que el de la base con nata, menos en la etapa de alcoholización de la grasa que no es necesario, ya que no presenta problemas microbiológicos. La materia grasa y los ingredientes se diluyen en agua a temperatura superior a 90°C y después se lleva a cabo la adición de alcohol.

1.3. Bebidas alcohólicas con base láctea

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria (R.T.S.) aprobada por el Real Decreto 1416/1982 para la elaboración, circulación y comercio de aguardientes compuestos, licores, aperitivos sin vino base y otras bebidas derivadas de alcoholes naturales, para que a una bebida se le pueda llamar crema debe tener una graduación alcohólica comprendida entre 24 y 30º GL y un contenido en azúcar superior a 250 gr. por litro. En el caso de estar elaborados a base de leche concentrada o nata y aguardientes compuestos, su graduación alcohólica podrá estar comprendida entre 15 y 18º GL.

Los licores de crema son productos compuestos cuyos principales ingredientes son grasa láctea, un aguardiente, caseinato sódico y azúcar, incluyendo a su vez emulsionantes, aromatizantes y colorantes. El aguardiente utilizado tiene que ser congenérico para equilibrar el aroma y sabor de los componentes lácteos e imponer un carácter identificable a la crema. El whisky es el aguardiente más comúnmente utilizado en las cremas de licores, pero también hay cremas basadas en brandy, en ron o en orujo. La mayoría de estos licores de crema son muy similares en cuanto a composición general y suelen constar de un 15% de grasa láctea, 20% de azúcar, 5% de caseinato sódico y un 14-17% de alcohol. También se elaboran licores con un contenido en alcohol inferior al 10%, pero son más susceptibles a las alteraciones microbianas provocadas por especies de *Lactobacillus*, por lo que es necesario someter el producto final a un tratamiento de pasteurización.

Fundamentalmente los licores de crema son emulsiones de grasa láctea en agua. Su elaboración comprende la formación de una emulsión que deberá permanecer estable hasta el momento del consumo siendo resistente al desnatado y a la formación de coágulos de grasa en el cuello de la botella (Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. 1996). La calidad de estos licores se fundamenta principalmente en su estabilidad y uniformidad siendo diversos los factores que pueden afectar al equilibrio entre componentes, y que por su relevancia son tratados en el apartado 1.3.3.3.

En el mercado podemos encontrar distintas variedades de cremas de licores que se distinguen en función del aguardiente que se ha utilizado (whisky, orujo o ron) y su grado alcohólico (entre 15-17º). Entre las cremas de licores en las que se utiliza el whisky como aguardiente se encuentra la marca más conocida por excelencia El *Baileys* "The original Irish cream" de 17º o el *Royal Swan* de 17º.

Las cremas en las que se utiliza el aguardiente de orujo son en las que encontramos más variedad de productos. Se encuentran marcas españolas como *Crema Ruavieja* de 17º, *Crema de Orujo Panizo* de 17º, *Crema Xantiamen* de 17º, *Crema de Orujo Pazo de Usía* de 15º, *Licor de Crema Regio* de 15º, entre otras.

Por último, en las que se utiliza el ron se encuentran marcas como *Barceló Cream* de 17º.

1.3.1. Proceso de elaboración de un licor de crema

En la Figura 3 se presenta el diagrama del proceso de elaboración de un licor de crema.

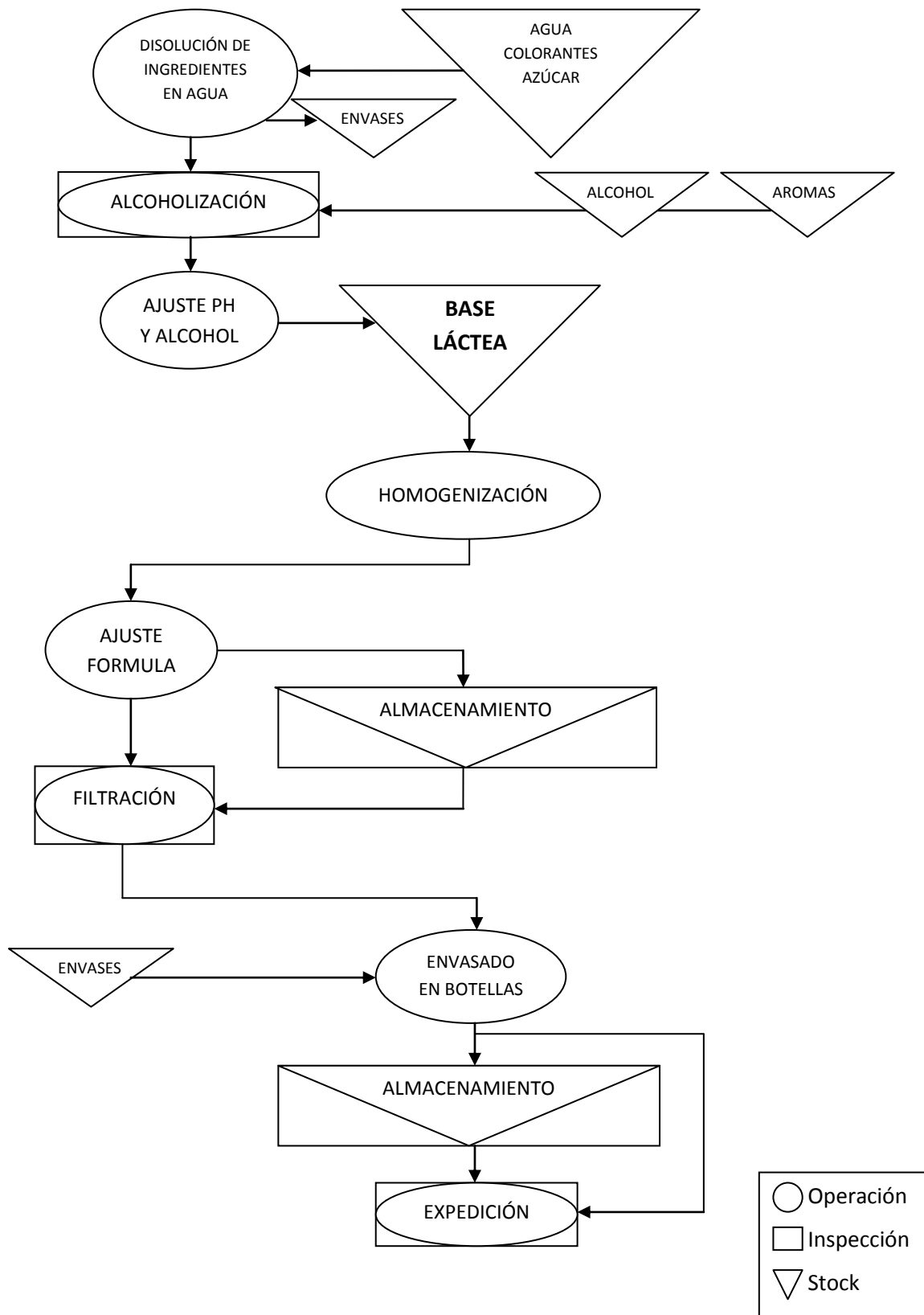


Figura 3 Esquema del proceso de elaboración de un licor de crema. Fuente: Elaboración propia.

La elaboración del licor de crema comporta:

Disolución de ingredientes en agua: disolver en agua de baja dureza los colorantes, el azúcar, el alcohol y los aromas en este orden con la ayuda de un agitador.

Ajuste pH y alcohol: ajustar el pH entre 6,8-7,2 con NaOH y comprobar que la graduación alcohólica del jarabe es de 17º OI.

Adición de la disolución en la base láctea: añadir lentamente el jarabe con agitación y evitando la incorporación de aire sobre la base láctea.

Homogeneización: reducción del tamaño de los glóbulos grasos de fase dispersa para conseguir la formación de una emulsión más estable a una temperatura de 55ºC y a una presión de 30 MPa.

Ajuste de fórmula: una vez terminado el licor de crema el laboratorio de Control de Calidad realizará los controles pertinentes (distribución de partículas, grado alcohólico, densidad, etc) y los ajustes de fórmula necesarios para que se adapte a las especificaciones del producto.

Filtración: como en la elaboración de la base láctea, se puede considerar un punto crítico de control, ya que se comprueba que no haya precipitado la caseína y se elimina cualquier materia extraña.

1.3.2. Características tecnológicas

Los ingredientes principales de la formulación son una base neutra a base de nata o grasas vegetales, azúcar, agua, alcohol etílico de 96º de uso alimentario, aromas y colorantes.

Los **aromas naturales** que se usan mayoritariamente son a base de extractos vegetales, principalmente cacao, almendra tostada y café, reforzado con aroma de vainilla y destilados cítricos. Tiene un aspecto líquido transparente y un color pardo oscuro. A nivel de colorantes, se usa tanto **colorantes sintéticos** como el colorante natural **caramelo**.

Los colorantes sintéticos (tartracina y rojo punzo) presentan una mayor estabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento en comparación con los naturales; en general, poseen un mayor poder tintóreo, de manera que sólo se precisan cantidades pequeñas para conferir el color deseado, lo que conlleva también un menor coste. Los colorantes usados

están certificados por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por “Food and Drug Administration” (FDA).

El caramelo es un colorante natural preparado mediante tratamiento térmico controlado de la glucosa, en presencia de compuestos sulfíticos y amónicos que actúan como catalizadores, obteniéndose un producto final de aspecto líquido y color pardo.

1.3.3. Importancia del proceso de emulsificación en los licores de crema

1.3.3.1. Características generales de las emulsiones

Las emulsiones intervienen en una inmensa cantidad de productos que utilizamos a diario, como cremas para el cuidado personal, algunos alimentos (helados, leche, mantequilla, aromas, bebidas refrescantes), productos agroquímicos, etc.

Una emulsión es una mezcla de líquidos inmiscibles de manera homogénea o también definidas como dispersiones de un líquido (fase dispersa) en el seno de otro (fase dispersante), siendo por tanto una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Los diámetros de las gotas líquidas que se encuentran dispersas se encuentran en el rango de 0,1 a 20 μm . Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensoactivos o emulsificantes que presentan la capacidad de absorción en las superficies de las gotas.

Las características más importantes que determinan la estabilidad de una emulsión son (Cheftel, J.; Besançon, P. y Cheftel, H. 1980-83; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. y Damodaran, S. 2010):

Tipo de emulsión aceite/agua (o/w) o agua/aceite (w/o). En la mayoría de las emulsiones una de las fases es acuosa y la otra un aceite polar. Las emulsiones con el aceite como fase dispersa se conocen como emulsiones de aceites en agua (o/w) y las emulsiones con el agua como fase dispersa se conocen como emulsiones de agua en aceite (w/o). Ejemplos de alimentos con emulsiones o/w serían la leche, los aliños de ensaladas y la mayoría de sopas y de emulsiones w/o serían la mantequilla y la margarina. La base láctea pertenece al tipo de o/w.

Distribución del tamaño de las gotas. Generalmente cuanto más pequeñas son las gotas más estables son las emulsiones, pero más energía y emulgentes son necesarios. El tipo óptimo de tamaño de partículas deberá oscilar entre 0,1 y 1µm.

Composición y espesor de la capa superficial alrededor de las gotas. Esto determina las propiedades interfaciales y las fuerzas de interacción coloidal, que afectan enormemente a la estabilidad física. En una emulsión cuanto más interacción entre la superficie de las gotitas y la fase dispersante menos tensión superficial y por lo tanto menos tendencia a rebajar la extensión de la interfase por coalescencia. Las emulsiones o/w o w/o son coloides hidrófobos que son estabilizados con la presencia o adición de agentes tensioactivos anfipolares (emulgentes). Estos agentes se absorben en la interfase donde un extremo de la molécula tiene afinidad por la fase acuosa y la otra por la fase lipídica evitando la coalescencia por colisión. Las fuerzas de interacción coloidal, que se caracterizan por que las partículas tengan las cargas electrostáticas del mismo signo, son el principal factor de estabilidad en las emulsiones y la modificación del pH o la adición de electrolitos pueden provocar una floculación casi instantánea.

Composición de la fase continua. La fase continua es aquella que solubiliza al agente emulsificante y su elección se hará en función de las propiedades hidrófilas e hidrófobas que posea y del tipo de emulsión en que deba ser aplicado.

1.3.3.2. Características de la emulsión de Licor de crema

El núcleo principal para la elaboración de un Licor crema, es la base láctea y dentro de ella la emulsión grasa-soporte (agua+Dextrina). Este tipo de emulsiones son extremadamente delicadas, ya que el equilibrio grasa-soporte es extremadamente inestable y aunque el caseinato sódico actúe como emulgente disminuyendo la tensión interfacial aceite-agua y como estabilizante confiriendo estabilidad coloidal a las gotas recién formadas (Casanova, F.H. y Cardona, T.S. 2004), la naturaleza de los propios componentes los hace muy vulnerables a cualquier cambio o modificación del medio en la que se utiliza.

La elaboración del licor crema consiste en la adición de una serie de componentes, aromas, colores sintéticos, azúcar, etc, sobre una base, que junto con la acción mecánica de agitación para la disolución de estos los convierte en elementos que pueden desestabilizar el equilibrio

de la emulsión, si no se toman las precauciones adecuadas (ver “1.3.3.3. Factores desestabilizantes”).

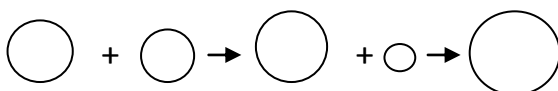
La fabricación del licor de crema aparenta ser un proceso simple, pero tan solo con un conocimiento de la naturaleza de los componentes y respetando rigurosamente el proceso establecido podemos tener éxito en su elaboración siendo uno de los tipos de bebidas de base láctea que más problemas presenta en el mercado.

1.3.3.3. Factores desestabilizantes de la emulsión en un Licor de Crema

Tal y como hemos indicado en el apartado anterior, el problema más importante es mantener la estabilidad de la emulsión frente a diversos factores que pueden provocar la rotura del equilibrio grasa-soporte (agua + Dextrina).

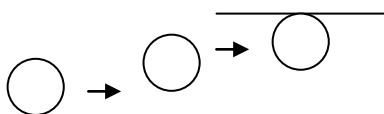
Esta rotura o separación de la fase grasa del soporte puede manifestarse según los casos por los siguientes efectos (Parkin, K. L.; Fennema, O. R. y Damodaran, S. 2010; <<http://es.scribd.com/doc/19447454/Emulsiones>>):

La maduración de Ostwald: crecimiento de los glóbulos más grandes de la emulsión a expensas de los más pequeños. La causa de este fenómeno es la diferencia de las presiones internas (presión de Laplace) entre los glóbulos de diferente tamaño.

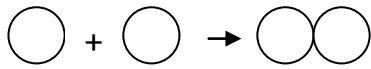


Generalmente debido a una homogeneización a una presión inferior a la necesaria para su completa dispersión.

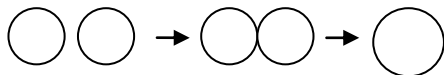
El Desnatado la fase dispersa se concentra en la parte superior debido a una insuficiente cantidad de emulgente que mantenga en equilibrio la fase grasa dentro del soporte o a causa de una homogeneización deficiente y separándose debido a la diferencia de densidad.



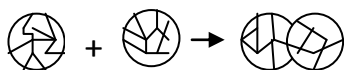
La Agregación o floculación de las partículas: las partículas permanecen unidas debido a fenómenos de interacción atractiva coloidal.



La Coalescencia es la unión entre sí de las partículas de grasa a causa de choques provocados por la agitación térmica o mecánica.



La Coalescencia Parcial se produce cuando parte de las gotas de aceite se solidifican o cristalizan generalmente por efecto de la temperatura o de un agente aglutinante pudiendo llegar a formar una masa o "terrón" irregular que se separa en superficie o fondo.



Factores físico-químicos que pueden desestabilizar la emulsión:

Variaciones de pH

Las variaciones de pH pueden provocar alteraciones importantes. El punto isoelectrico de las caseínas es alrededor de 4,6, una disminución del pH provoca su agregación y precipitación dando lugar a la separación de fases de la emulsión. Un aumento del pH también puede provocar pardeamientos por reacciones de Maillard de las proteínas (Caseína) o reacciones de esterificación de los aromas con cambios organolépticos. La adición de una sustancia tampón (Citrato Sódico) es recomendable para amortiguar las ligeras modificaciones de pH que puedan haber en el medio.

Variaciones de graduación alcohólica

Puede provocar la formación de cristales de grasa en la superficie debido a la coalescencia parcial provocada por la poca solubilidad de las proteínas en etanol, así como precipitación de las proteínas.

Presencia de iones calcio y magnesio de las aguas utilizadas

El uso de aguas duras e incorrectamente tratadas puede dar como resultado la desestabilización de la bebida. Un exceso de iones calcio y magnesio produce la formación de grandes agregados debido a la alta sensibilidad de las caseínas al calcio. Este problema se puede reducir añadiendo hexametáfosfato sódico que actúa como secuestrante del calcio.

Agitación violenta

La agitación violenta provoca principalmente “Coalescencia” del medio con rotura de la interacción del emulgente y llegando a separar la fase grasa “Desnatado” además provoca la incorporación de aire que puede facilitar la formación de micelas de grasa que quedan atrapadas en las gotas de aire.

Determinados espesantes

Antes de añadir cualquier ingrediente nuevo hay que comprobar que sea compatible con la formulación del producto. Ciertos espesantes como pectinas, carragenatos, carboximetilcelulosa, no son apropiados en medios alcohólicos por su dificultad de disolución pudiendo su insolubilización provocar la separación del medio.

El orden de adición de productos

La adición de productos a la base láctea se ha de realizar lentamente y sobre el centro de agitación para facilitar la dispersión de los productos y siempre siguiendo el orden establecido por el fabricante porque podrían darse problemas de solubilidad de los ingredientes.

La temperatura de conservación

El producto debe ser guardado a temperaturas entre 5-20°C. Una temperatura alta acelera todas las reacciones y pueden darse reacciones de Maillard y enranciamiento de la nata.

La luz

La emulsión debe ser protegida de la luz, ya que acelera las reacciones de Maillard y todas las demás reacciones que favorecen el pardeamiento no enzimático.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es estudiar el comportamiento del licor de crema realizado con una base láctea; ya sea a partir de nata o a partir de grasa de coco, cuando es sometida a distintas alteraciones y establecer una guía de apoyo que sirva para resolver futuras incidencias.

Para esto se realizará un estudio analítico (físico-químico, instrumental, microbiológico) de:

- Licor de crema con base láctea a partir de nata o a partir de grasa de coco sin alterar o patrón.
- Licor de crema con base láctea a partir de nata o a partir de grasa de coco alterada a tiempo 0.
- Licor de crema con base láctea a partir de nata o a partir de grasa de coco alterada conservada durante un período de dos meses a temperatura ambiente o a 35°C (equivalente a 8 meses de vida comercial).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

Se preparan 2 bebidas de licor de crema a partir de dos bases diferentes; una a partir de una base láctea en base a nata (SLV2) y otra a partir de grasa de coco (SLV6), cuyas características se especifican en la Tabla 7. Con la caracterización de los licores de crema en condiciones normales se obtiene un patrón que nos permitirá compararlo con la bebida alterada.

De cada una de los licores de crema a controlar, se preparan 2 litros, 1 litro de esta permanecerá a temperatura ambiente durante el estudio de estabilidad y el otro en una estufa a 35°C que nos permitirá hacer un estudio acelerado donde dos meses equivalen a 8 meses (Figura 4).

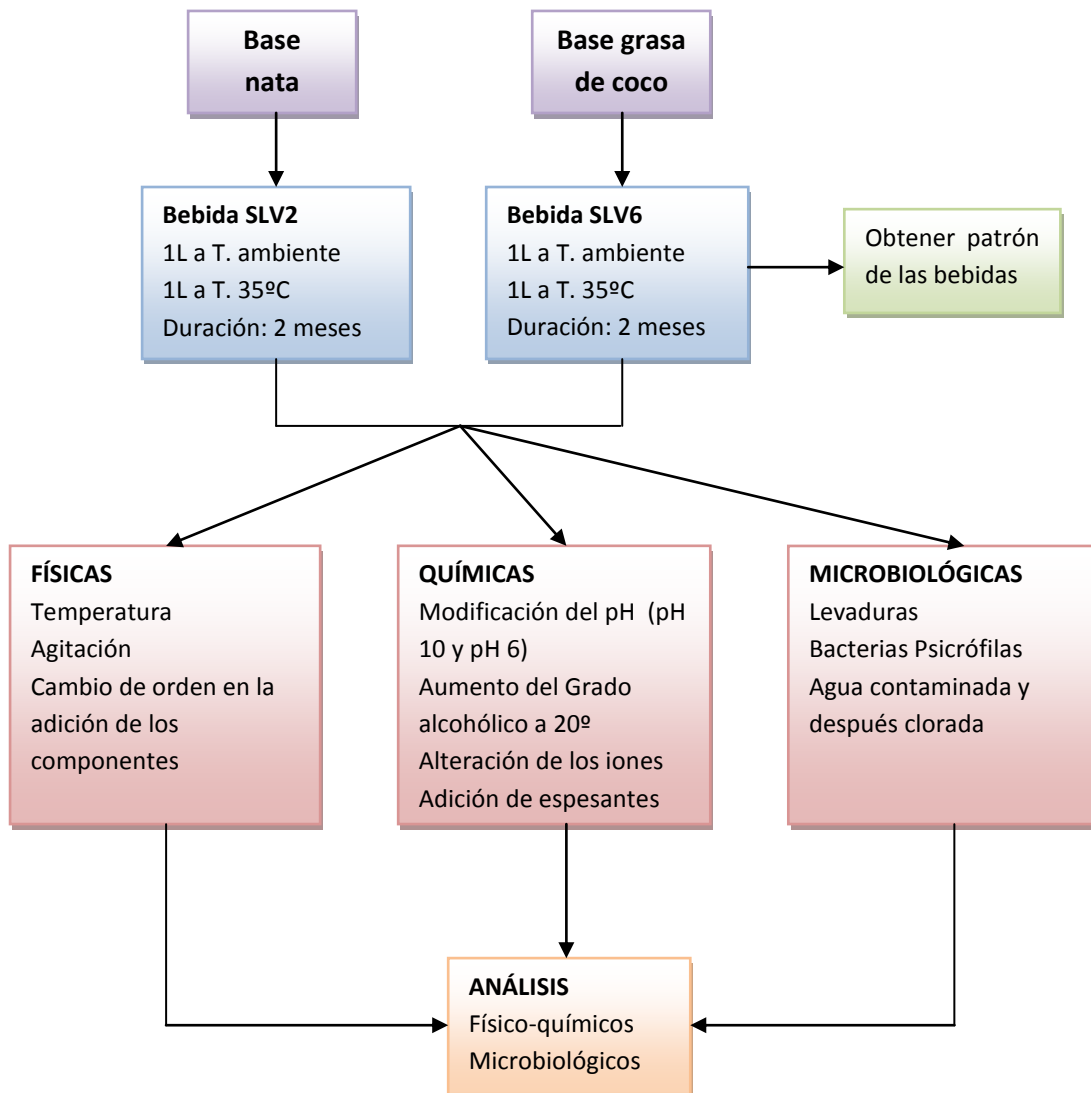


Figura 4 Esquema del diseño experimental.

En la Tabla 3, Tabla 4 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran las características de las distintas alteraciones y los parámetros evaluados en cada una de ellas.

Tabla 3 Alteraciones físicas utilizadas y parámetros evaluados.

Alteraciones	Condiciones de trabajo	Parámetros controlados	
		Comunes	Específicos
Temperatura	85°C 15min	pH Densidad Distribución de Partículas	Alcohol Azúcares por HPLC Ácidos por HPLC
Agitación con rotomix	Rotor preemulsión Velocidad:16000rpm Tiempo: 10min	Viscosidad Sedimento de Centrifugación	
Adición de los componentes en diferente orden	Orden: Base láctea, azúcar, colorantes, alcohol, aromas y agua		

Tabla 4 Alteraciones químicas utilizadas y parámetros evaluados.

Alteraciones	Soluciones de trabajo	Parámetros controlados	
		Comunes	Específicos
Modificación a pH 10	NaOH 10%	pH Densidad Distribución de Partículas Viscosidad	Azúcares por HPLC Ácidos por HPLC Cationes (Na, K, Mg, Ca)
Modificación a pH 6	ácido cítrico 20%	Sedimento de Centrifugación	Azúcares por HPLC Ácidos por HPLC
Aumento del Grado Alcohólico a 20º	130ml alcohol etílico de 96º		Alcohol
Alteración de los iones	Agua de red		Cationes (Na, K, Mg, Ca)
Adición de espesantes	Genupectin 9g/L		

Tabla 5 Alteraciones microbiológicas utilizadas y parámetros evaluados.

Alteraciones	Condiciones de trabajo	Parámetros controlados	
		Comunes	Específicos
Levaduras	<i>Hansenula anomala</i>	pH Densidad	Recuento de levaduras
Bacterias Psicrófilas	<i>Pseudomona fluorescens</i>	Distribución de Partículas	Recuento de aerobios Psicrófilos
Agua contaminada y después clorada	<i>P. fluorescens</i> 0,5ppm de Cl activo	Viscosidad Sedimento de Centrifugación	Recuento de aerobios Psicrófilos

3.2. Características de los materiales utilizados en este ensayo

Los materiales utilizados para la elaboración de los licores de crema son: alcohol de 96% de uso alimentario, base láctea de nata o grasa de coco, azúcar, agua, aromas y colorantes.

Como se puede ver en la Tabla 6 la base de nata y la de coco tienen características similares, aún teniendo orígenes distintos. La base de nata tiene un porcentaje más alto de materia grasa y de proteína y presenta una concentración más alta de los cationes analizados, sobretodo del Ca^{2+} y K^{+} .

Tabla 6 Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas de las bases neutras comerciales de nata y de grasa de coco.

		Nata		Grasa de coco	
Descripción	Unidades	V. Min.	V. Max	V. Min	V. Max
Componentes mayoritarios					
Materia grasa	p/v (%)		12,8		11,7
Proteína	p/v (%)		3,4		3
Sacarosa	p/v (%)		21,5		21,5
Cont. en alcohol (destilación)	%	16,8	17,2	16,8	17,2
Grasa	%	12	14	10	12
Características físico-químicas					
pH		6,8	7,2	6,8	7,2
Densidad rel a 20°C		1,09	1,10	1,09	1,10
Dis. Partículas	µm	0,40	0,50	0,40	0,50
Viscosidad	Cps	50	70	40	60
N. Amínico	mg/100mL	20	40	15	30
Sedimento de Centrifugación	%		0		0
Características microbiológicas					
Bacterias aerobias mesófilas	ufc/g		200		200
Bacterias proteolíticos	ufc/g		100		100
Bacterias lipolíticas	ufc/g		100		100
Levaduras lipolíticas	ufc/g		50		50
Bacterias aerobios psicrófilos	ufc/g		100		100
Características organolépticas					
Olor		Característico		Característico	
Sabor		Característico		Característico	
Aspecto		Líquido		Líquido	
Color		Blanco		Blanco	
Cationes					
Na ⁺	ppm		1404,4		1358,1
K ⁺	ppm		313,0		25,9
Mg ²⁺	ppm		19,5		2,8
Ca ²⁺	ppm		321,0		71,3

Las características principales del licor de crema elaborado se encuentran en la Tabla 7. La principal diferencia entre las dos bebidas es que SLV2 contiene ácido láctico y lactosa y presenta una mayor concentración de iones Ca²⁺ y K⁺, mientras que la SLV6 presenta una concentración superior en maltosa y maltotriosa.

Tabla 7 Características de los licores de crema elaborados con base de nata (SLV2) y con base de grasa de coco (SLV6).

Descripción	Unidades	SLV2	SLV6
Características físico-químicas			
pH		7,07	7,28
Cont. en alcohol (destilación)		15	15
Densidad rel. a 20°C		1,1002	1,098
Dis. Partículas	µm	0,47	0,43
Viscosidad	Cps	36	32
Grasa	%	6,6	6,7
Acidez	% ac. Cítrico	0,047	0,021
N. Amínico	mg/100mL	15,75	13,43
Sedimento de Centrifugación	%	0	0
Características microbiológicas			
Bacterias aerobias mesófilas	ufc/g	<50	<50
Bacterias aerobias psicrófilas	ufc/g	<20	<20
Mohos y levaduras	ufc/g	0	0
Características organolépticas			
Olor		Característico	Característico
Sabor		Característico	Característico
Aspecto		Líquido	Líquido
Color		Pardo, 6C4 escala Methuen	Pardo, 6C4 escala Methuen
Ácidos			
Láctico	g/L	0,98	-----
Cítrico	g/L	1,01	0,94
Azúcares			
Sacarosa	g/L	219,36	220,51
Lactosa	g/L	3,65	-----
Maltosa	g/L	2,18	4,13
Maltotriosa	g/L	3,69	6,43
Cationes			
Na ⁺	ppm	1000,8	1014,1
K ⁺	ppm	253,3	111,4
Mg ²⁺	ppm	21,4	11,0
Ca ²⁺	ppm	248,2	50,3

3.3. Métodos de análisis: Parámetros fisicoquímicos

3.3.1. Determinación del pH

Se midió directamente introduciendo en un vaso alrededor de 30 mL de muestra, sumergiendo el electrodo de vidrio (electrodo indicador con KCl 3M-AgCl) y electrodo de referencia CAT para corrección de temperatura, agitando suavemente hasta lectura estable del pH.

3.3.2. Determinación de la viscosidad

Se llenó el vaso de precipitados de 500 mL con 500 mL de la muestra a analizar y se atemperó a 20°C durante aproximadamente 20 minutos en un baño.

Se conectó el viscosímetro VISCO STAR-R y se realizó un Auto test. Se seleccionó el huesillo (rotor) a utilizar y la velocidad y se introdujo en la muestra a analizar cuidando que el nivel del líquido llegará al punto de inmersión específico del huesillo. En nuestra muestra se utilizó RV1 / 60 r.p.m. El resultado se expresa en centipoise (c.p.s.)

3.3.3. Determinación del contenido en alcohol

Se midieron 250 mL aproximadamente de la muestra a analizar en un matraz aforado y se atemperó a 20°C durante 30 minutos en un baño termostatzado, se enrasó exactamente 250 mL y se pasó cuantitativamente el volumen medido en el matraz de 1000 mL de capacidad de fondo redondo y boca esmerilada, lavando tres veces consecutivas el matraz de 250 mL con un total de 250 mL de agua destilada para arrastrar toda la muestra.

A los 500mL de muestra del matraz de destilación se añadieron un par o tres de piedras Pómez para facilitar una ebullición uniforme y 0,1/0,2 mL de antiespumante para evitar formaciones de espuma en productos con alto contenido en sólidos. Se colocó el matraz de 1000 mL en la manta eléctrica.

El matraz de recogida del destilado se sumergió 2/3 partes con agua con hielo para mantener una temperatura inferior a 10°C. El refrigerante debe ir dotado con una largura que penetre por lo menos 4-6 mm en el cuello del matraz y la unión de la salida del refrigerante con el matraz se selló con cinta "Parafilm" para evitar las más mínimas pérdidas posibles. Se colocó una pipeta Pasteur en esta unión agujereando el "Parafilm" para evitar que se hiciera el vacío.

Cuando se recogieron aproximadamente 240 mL, se atemperó el matraz a 20°C durante 15 minutos y se enrasó con agua destilada a 250 mL, se homogeneizó y se procedió a la

determinación del contenido en alcohol mediante la medida de la densidad del destilado (por triplicado) utilizando el densímetro automático “ANTON PAAR” y obteniendo el grado alcohólico directamente por conversión con tablas internas. (UNE 33-112-75; A.O.A.C. 1990)

3.3.4. Determinación del contenido en N-Amínico

Se pesaron 5 g de la muestra en el vaso adecuado del valorador, se añadió aproximadamente 50 ml de agua destilada y se sujetó en el brazo soporte del valorador automático “METTLER DL50GP” con electrodo “Crison de pH 52-21” y solución saturada de KCl. Se realizó la valoración con NaOH 1N con bureta automática, cuando se indica que hay que cambiar a la bureta de NaOH 0,1N añadir 2 mL de H₂O₂ al 30% cuando se sospecha de la existencia de SO₂ y poner en marcha la bureta de NaOH 0,1N. Se obtiene el resultado de la acidez expresado en % de ácido cítrico.

A continuación se añaden 20 mL de solución Formaldehído al 30% (previamente ajustado a pH 8,1) y conectar la bureta de NaOH 0,1N. Se obtiene el resultado de N-Amínico expresado en mg de N-Amínico %. (I.F.U. nº 30, 1965).

3.3.5. Determinación de la densidad

Se llenó una cubeta con el líquido problema que se introdujo en el carro portamuestras. A continuación se verificó que la celdilla del densímetro “ANTON PAAR DMA 4500” marcaba una densidad de entre 0,0010-0,0016 (densidad del aire), lo que indica que se hallaba limpia y en condiciones para recibir la muestra. Finalmente se conectó el START y en el espacio de 60 a 90 segundos nos da el valor de la densidad. El resultado no tiene unidades ya que se expresa en densidad relativa, obtenida de la división entre la densidad de la muestra a 20°C y la densidad del agua a 20°C.

3.3.6. Determinación de la distribución de partículas

Para la determinación de la distribución de partículas se usa el aparato “Mattersiser Microplus MICRO-P”.

Condiciones de trabajo de la unidad óptica:

Velocidad de bomba:	2000 r.p.m.
Ultrasonidos:	Variable según muestra, por defecto 12,00
Tiempo Ultrasonidos:	Variable según la muestra, por defecto, 0,1

En un vaso de precipitados de 500 mL se pusieron 500 mL de agua destilada y se añadió gota a gota el producto problema a analizar con la ayuda de una pipeta hasta obtener una concentración de “Obscuración” alrededor del 20%.

Una vez estabilizada la medida se apretó “Tabulador” y apareció el gráfico definitivo en la escala que se seleccionó según si son emulsiones (5C001) o bases lácteas (5RHD).

Los resultados de cada gráfica se comparan con la gráfica tipo de cada producto.

3.3.7. Determinación del sedimento de centrifugación

Se llenó un tubo de centrífuga de 10 mL y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 r.p.m. A continuación se leyó el sedimento obtenido, en el caso que sea menor de un 1% se considera 0 (*Método propio del Dep. Control de Calidad de Dallant, SA*)

Se calcula:

% Sedimento=Medida en mL del tubo x 10

El resultado se expresará con un decimal y en %.

3.3.8. Determinación del contenido en grasa

Se pesaron 10g aproximadamente de la muestra y se depositaron en el embudo de decantación.

Se añadió 10mL de hidróxido de amonio, se mezcló y se repitió con 10ml de etanol al 95%. Después se añadieron 25mL de éter dietílico, se tapó el embudo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto, se destapó en medio de la operación para eliminar los gases formados. Se agregaron 25mL de éter de petróleo y se repitió la agitación vigorosa.

Se dejó reposar el embudo observando la separación de las dos fases, se decantó la fase acuosa (inferior) en un segundo embudo de decantación y se depositó la orgánica (superior) en el balón de 100mL previamente tarado.

Se efectuaron dos extracciones más al líquido acuoso utilizando 15mL de éter dietílico y luego 15mL de éter de petróleo para cada extracción.

Se evaporaron completamente los disolventes recogidos en el balón mediante un rotavapor y se acabó de eliminar la parte orgánica en una estufa durante 1 hora. Se enfrió en un desecador y se pesó. (A.O.A.C., 16.064; Matissek, R.; Schnepel, F.-M. y Steiner, G. 1998)

$$\%grasa\ en\ muestra = \frac{Peso\ final - Tara}{Peso\ muestra} * 100$$

3.3.9. Determinación de los ácidos orgánicos por HPLC: cromatografía de partición en fase reversa

Determinación del contenido de ácidos orgánicos (Oxálico, Tartárico, Quínico, DL-Málico, Cítrico, Láctico, Acético, Fumárico y Propiónico). (A.O.A.C.1993 vol. 76 nº3 modificado por el Dep. Control de Calidad de Dallant, SA).

Condiciones de trabajo

- Sistema HPLC. Compuesto por:
 - Bomba Waters 2695 Alliance.
 - Columna Synergy Hydro 250x4,6mm 4µm
 - Horno a 27°C
 - Detector UV
- Fase Móvil
 - 50mM KH_2PO_4 a pH=2,9 (ajustar con HCl)
 - Velocidad de flujo: 0,7ml/min
 - Temperatura: 27°C

Calibración: Se inyectaron patrones de ácidos de concentraciones similares a la muestra (0,5g-1g-1,5g/Kg) (Figura 5). A partir de los resultados se obtuvo la recta de calibración.

Análisis: Se preparó una dilución de la muestra 20g/L tal que, el contenido de los ácidos en esta solución sea lo más parecida posible a la del patrón.

El resultado viene expresado en % (p/p)

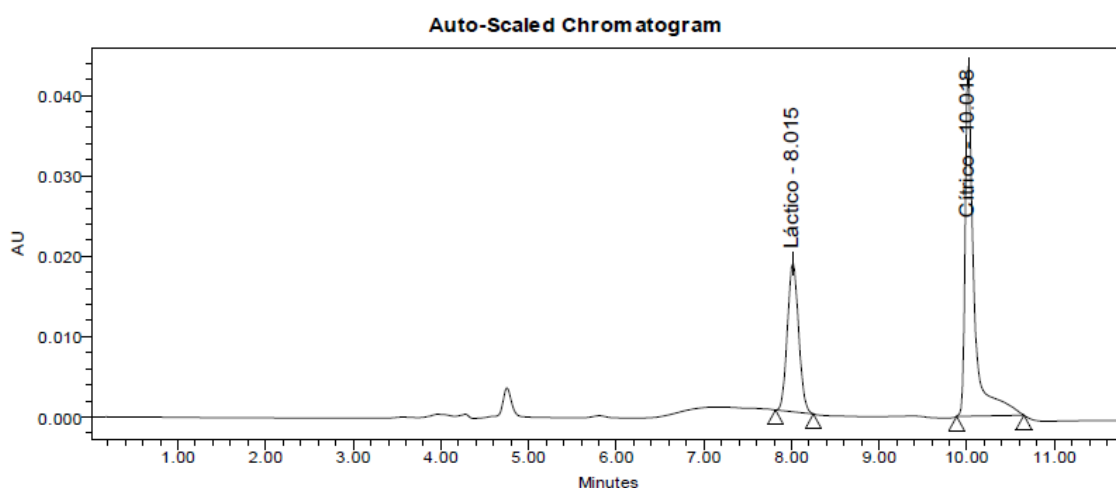


Figura 5 Cromatograma de los patrones usados para la determinación de los ácidos orgánicos.

3.3.10. Determinación de los azúcares por HPLC: cromatografía de partición en fase reversa a gradiente por ELSD

Determinación del contenido de azúcares (Fructosa, Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Sorbitol, Maltotriosa y Maltotretosa), mediante análisis por HPLC. (*Método propio del Dep. Control de Calidad de Dallant, SA*).

Condiciones de trabajo

- Sistema HPLC. Compuesto por:
 - Bomba con gradiente Waters 600.
 - Columna Prevail Carbohydrate ES 5u
 - Horno a 30°C
 - Detector ELSD¹ (Evaporative light scattering detection) Waters 2424
- Fase Móvil
 - A: Acetonitrilo calidad HPLC
 - B: Agua filtrada 0,2 micras
 - Velocidad de flujo: 1ml/min
 - Temperatura: 30°C

Los tiempos y concentraciones de la fase móvil utilizados en el método a gradiente son los siguientes:

Tiempo (min)	Fase A (ACN)	Fase B (Agua)
0,00	100	0
0,02	80	20
20,0	60	40
25,0	40	60
25,01	100	0

Procedimiento

Calibración: Se inyectaron patrones de azúcares de concentraciones similares a la muestra (Figura 6) y se efectuó la recta de calibración.

Análisis: Se diluyó un gramo de muestra en un litro de agua destilada. A continuación se filtró con jeringa por filtros de nylon de 0,22 micras y se inyectó.

El resultado viene expresado en % (p/p)

¹Es un procedimiento por el cual el flujo de disolvente del HPLC es nebulizado y las gotas resultantes son arrastradas en una corriente de gas. Entonces, la fase móvil en forma de gotas es evaporada. Cuando un analito es menos volátil que la fase móvil, permanece en la corriente de gas como una partícula de soluto "seca" y fluye a la región de detección del detector ELS donde un haz de luz intersecta con la corriente. Las partículas dispersan el haz de luz y el

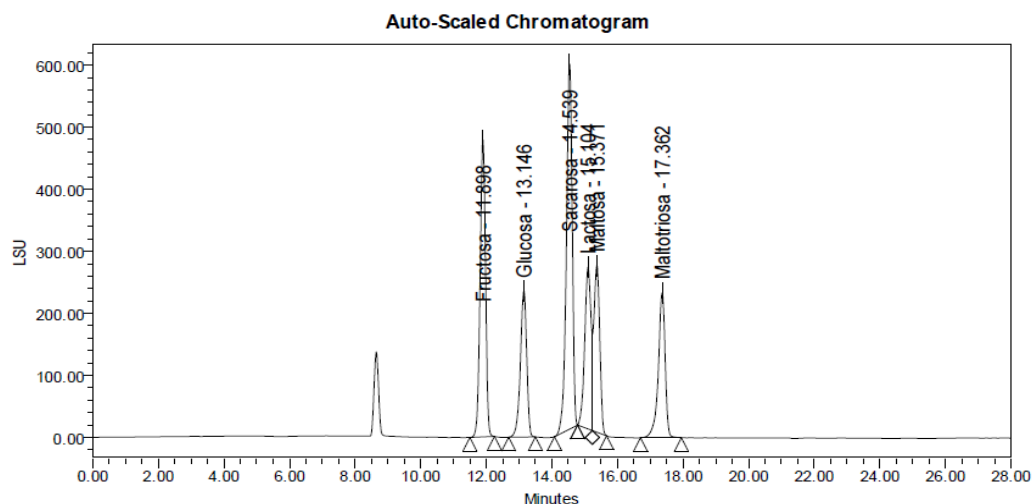


Figura 6 Cromatograma de los patrones usados para la determinación de los azúcares.

3.3.11. Determinación de los iones Na, K, Ca, Mg: HPLC de intercambio iónico

Determinación del contenido en cationes (Sodio, Potasio, Magnesio y Calcio) por HPLC.

(A.O.A.C. 1990 modificado por el Dep. Control de Calidad de Dallant, SA).

Condiciones de trabajo

- Sistema HPLC. Compuesto por:
 - Bomba con gradiente Waters 600.
 - Columna Altech Universal Cation 100x4,6mm 7μm
 - Horno a 35°C
 - Detector de Conductividad Waters 432
- Fase Móvil en régimen Isocrático
 - Tampón 3mM Tartárico y 2mM Oxálico
 - Velocidad de flujo: 1,5ml/min
 - Temperatura: 35°C

Procedimiento

Calibración: Se inyectaron patrones de cationes (Na, K, Mg y Ca) de una concentración de alrededor de 20mg/L. Las cantidades de cada sal patrón se pesaron con una balanza de precisión y se diluyeron en un litro de agua de osmosis con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Se efectuó la recta de calibración.

Análisis: Se preparó una dilución de la muestra, tal que, el contenido del catión en esta solución sea lo más parecida posible a la del patrón. A continuación se filtró con jeringa por filtros de nylon de 0,22 micras y se inyectó.

El resultado viene expresado en ppm.

3.4. Parámetros microbiológicos

3.4.1. Recuento total de bacterias aerobias mesófilas, psicrófilas y mohos y levaduras.

Recuento total de bacterias aerobias mesófilas

Determinación del número total de microorganismos por recuento de colonias obtenidas en un medio sólido después de una incubación a 30°C en aerobiosis durante 72 horas. Se utiliza el agar por *Método Standard* (23,5g/L de agua destilada). (CeNAN 1982)

Recuento total de bacterias aerobias psicrófilas

Determinación del número total de microorganismos por recuento de colonias obtenidas en un medio sólido después de una incubación a 22°C en aerobiosis durante 5 días. Se utiliza el agar por *Método Standard* (23,5g/L de agua destilada). (CeNAN 1982 modificado por Dallant, SA)

Mohos y levaduras

Determinación del número total de mohos y levaduras por recuento de colonias obtenidas en un medio sólido después de una incubación a 22°C en aerobiosis durante 5 días. Se utiliza el agar Glucosa Sabouraud + Cloranfenicol (65g/L de agua destilada). (CeNAN 1982)

3.4.2. Inoculación de una levadura

Se utilizó una levadura previamente aislada con el método de siembra por agotamiento, obtenida de una base neutra de nata sin alcoholizar que estaba contaminada (Figura 7).

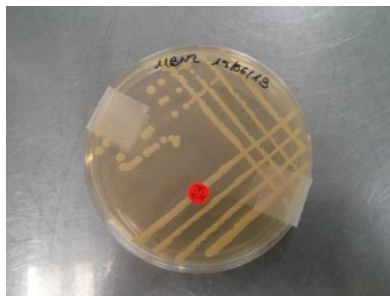


Figura 7 Levadura aislada mediante siembra por agotamiento.

Procedimiento

1. Preparación del inóculo. Se realizó una suspensión de la cepa de trabajo de una concentración de 10^8 ufc/mL que equivale a una D.O.=0,6 a 580nm. Se utilizó un espectrofotómetro para medir la turbidez. Para comprobar que la suspensión equivale a 10^8 ufc/mL se diluyó la suspensión hasta que el número de colonias se pudiera contabilizar en placa (30-300 ufc/g) y se sembró.
2. Se inocularon 5ml de la suspensión en 500mL de producto para obtener una concentración final de 10^5 - 10^6 ufc/mL. El volumen del inóculo no debe exceder del 1% del peso o volumen de la muestra.
3. Las muestras se examinaron a tiempo 0, 48h, 7 y 14 días.
4. En cada muestreo (t= 0, 48h, 7 y 14 días) se realizaron las diluciones adecuadas utilizando agua de peptona o agua de ringer.
5. Se incubaron a 22°C durante 5 días en estufa.
6. Lectura de los resultados.

3.4.3. Identificación de la levadura

Para la identificación de levaduras se usó la galería API 20 C AUX de Biomérieux.

Procedimiento

Preparación de la galería: se repartieron 5mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.

Preparación del inóculo: se abrió una ampolla de API Suspension Medium (2mL) y se extrajo con una pipeta por aspiración o por toques sucesivos una fracción de la colonia hasta que se obtuvo una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. A continuación se abrió una ampolla de API C Medium y se transfirió a él 100µL de la suspensión anterior y se homogeneizó con la pipeta.

Inoculación de la galería: se llenaron las cúpulas con la suspensión obtenida en el API C Medium procurando que no se creará un nivel cóncavo. Se cerró la cámara de incubación e se incubó 48-72 horas (± 6 horas) a $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Lectura de la galería: después de 48 horas de incubación, o de 72 horas (si los ensayos, en particular la glucosa no resultaban muy claros después de 48 horas), se observó el crecimiento

de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Si la cúpula tenía una mayor turbidez que la del control indicaba una reacción positiva que hay que anotar en la hoja de resultados (Figura 8).



Figura 8 Lectura de la galería.

Interpretación de los resultados: la identificación se basa en un perfil numérico. En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y se asigna para cada uno un valor 1, 2 o 4. Sumando al interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico.

3.4.4. Inoculación de una *Pseudomona*

Se compró una cepa liofilizada de referencia ATCC de *Pseudomona fluorescens* a los laboratorios Scharlab (productos de MICROBIOLOGICS).

Preparación de la cepa

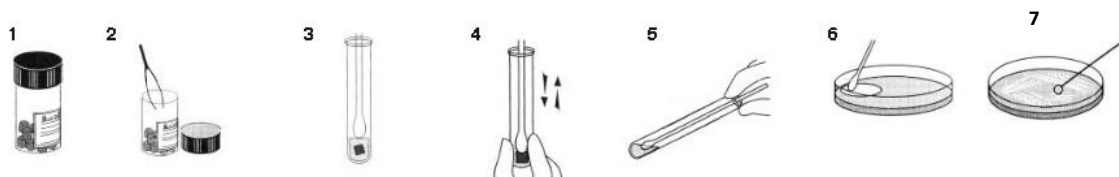


Figura 9 Procedimiento de recuperación de la cepa liofilizada. Fuente: Manual de Scharlab.

1. Se sacó del lugar de almacenamiento y se esperó a que adquiriera la temperatura ambiental.
2. Se cogió el "pellet" con pinzas estériles.
3. Se introdujo el "pellet" en un tubo con 0,5 ml de fluido estéril.
4. Se aplastó el "pellet" con un escobillón estéril.
5. Se saturó el escobillón con la suspensión hidratada.
6. Primero se inoculó una placa petri haciendo rodar el escobillón en un área circular de unos 25 mm de diámetro.

7. A continuación, y con un asa estéril, se sembró a partir de la zona inoculada extendiendo la siembra para facilitar el aislamiento colonial.
8. Se incubó la placa rápidamente a 30°C durante 3 días.
9. Se tapó el vial y se almacenó entre 2°C y 8°C.

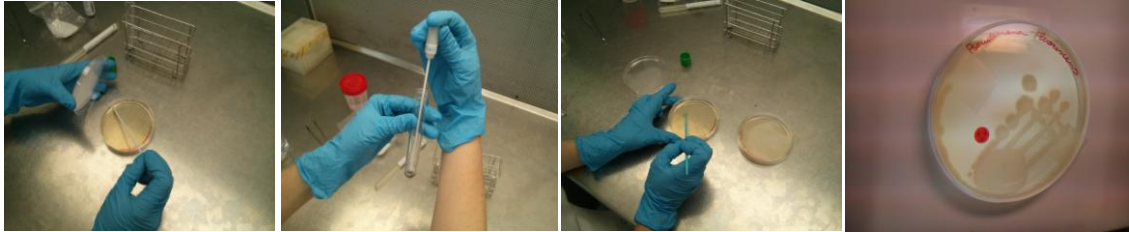


Figura 10 Procedimiento de la preparación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

Procedimiento de inoculación

Se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el de inoculación de levaduras, pero con D.O.=0,5 a 580nm y con el método de siembra usado para el recuento total de bacterias aerobias psicrófilas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efectos de las alteraciones físicas en bebidas alcohólicas con base láctea

4.1.1. Efecto de la temperatura

Se aplica una temperatura de 85°C durante 15 minutos a las muestras SLV2 y SLV6 simulando una empresa que trabaja a altas temperaturas para acelerar la disolución de los ingredientes. Se realizan los análisis especificados en la Tabla 8.

Observaciones a tiempo 0

Se produce una reducción del grado alcohólico atribuibles a la vaporización por efecto de la temperatura aplicada. La distribución de partículas, el indicador más claro para saber si se ha producido una desestabilización de la emulsión, presenta valores medios similares al patrón en ambas muestras. El pH, la densidad y el sedimento de centrifugación se encuentran dentro de los límites usuales, es decir, no se ha producido ningún cambio que indique la desestabilización del producto. El **color se ha modificado ligeramente** respecto al patrón debido al pardeamiento no enzimático producido por las reacciones entre los aminoácidos de las proteínas del cacao y los glúcidos de los azúcares.

Tabla 8 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las bebidas a tiempo 0 y a lo largo del tiempo.

MUESTRAS	pH			% Alcohol (Destilación)	Densidad rel. a 20°C	Dis. Partículas (µm)		
	t=0	MES 1	MES 2	t=0	t=0	t=0	MES 1	MES 2
SLV2								
PATRÓN	7,07	--	--	15,00	1,1002	0,47	--	--
T. AMB	7,04	--	6,94	12,66	1,1095	0,46	0,44	0,44
T. 35°C		--	6,85				0,43	0,43
SLV6								
PATRÓN	7,28	--	--	15,67	1,0980	0,43	--	--
T. AMB	7,28	--	7,00	13,51	1,1021	0,43	0,42	0,42
T. 35°C		--	6,98				0,43	0,42

El análisis de azúcares y ácidos (Tabla 9) nos indica que el azúcar mayoritario en las dos bebidas es la sacarosa con valores alrededor de 260 mg/L en ambas preparaciones. La principal diferencia entre las dos bebidas radica en que la bebida preparada con base de nata (SLV2) contiene ácido láctico y lactosa. Los análisis de azúcares y ácidos, nos indican que no se ha

producido ningún cambio representativo por efecto de la alteración. El aumento relativo de la concentración de sacarosa en las dos bebidas, se puede atribuir a la pérdida de agua (aproximadamente de un 10-12%) producida por su vaporización por efecto de la temperatura. El control de los azúcares se ha realizado para determinar si había existido inversión de la sacarosa a fructosa-glucosa tras el tratamiento térmico comprobando que no ha habido ningún tipo de modificación. Este control sólo se realiza una vez, ya que según investigaciones previas de la empresa los azúcares y los ácidos no se ven alterados en el tiempo.

Tabla 9 Efecto de la alteración por temperatura sobre los azúcares y los ácidos

	PATRÓN SLV2	SLV2 (85°C)	PATRÓN SLV6	SLV6 (85°C)
ÁCIDOS (g/L)				
Láctico	0,98	1,19	---	---
Cítrico	1,01	1,24	0,94	0,99
AZÚCARES (g/L)				
Sacarosa	219,36	260,45	220,51	264,18
Lactosa	3,65	6,01	---	---
Maltosa	2,18	2,56	4,13	4,56
Maltotriosa	3,69	5,25	6,43	7,30

Observaciones a los dos meses

El único efecto que se ha podido observar tras los dos meses en ambas bebidas es la **aparición de una capa blanca en la superficie** que se ha ido acentuando con el tiempo, y que podríamos catalogar como **desnatado** o “**creaming**”, motivado generalmente por una homogeneización inadecuada de la bebida (Banks, W. y Muir, D.D. 1985).

Es importante considerar que las bebidas elaboradas para este estudio no pudieron ser homogeneizadas, por no disponer de aparato homogeneizador, por tanto, esta alteración ocurrirá igualmente en las demás bebidas alteradas.

4.1.2. Efecto de la Agitación

Con la aplicación de una agitación violenta se pretendía romper la emulsión. Para conseguirlo se ha usado el agitador MICCRA D-9 con agitador para pre-emulsión, pero en las condiciones de trabajo utilizadas, velocidad de 16.000rpm durante 10 minutos, no se ha conseguido la ruptura de la emulsión. Tras el ensayo se ha procedido a evaluar los parámetros de pH, densidad y distribución de partículas (Tabla 10).

Tabla 10 Efecto de la agitación sobre la estabilidad de las bebidas a tiempo 0 y a lo largo del tiempo

MUESTRAS	pH			Densidad rel. a 20°C			Dis. Partículas (µm)		
	t=0	MES 1	MES 2	t=0	MES 1	MES 2	t=0	MES 1	MES 2
SLV2									
PATRÓN	7,07	--	--	1,1002	--	--	0,47	--	--
T. AMB	7,01	--	7,01	1,1014	--	1,1039	0,45	0,42	0,42
T. 35°C		--	6,90		--	1,1027		0,43	0,43
SLV6									
PATRÓN	7,28	--	--	1,098	--	--	0,43	--	--
T. AMB	7,23	--	7,17	1,0982	--	1,0986	0,41	0,43	0,43
T. 35°C		--	7,13		--	1,0987		0,43	0,43

Observaciones a tiempo 0

Los parámetros analizados no presentan ningún cambio respecto al patrón.

Observaciones a los 2 meses

No presentan variación con respecto a los datos originales. En este caso, también se ha producido un desnatado, tanto en la bebida SLV2 como en la SLV6 (Figura 11).



Figura 11 Aparición de desnatado en la bebida.

En el estudio se consideró utilizar el agitador pre-emulsión por ser el que disponíamos con más revoluciones de agitación, esperando que el efecto sobre la estructura de la emulsión fuera lo más enérgica posible. El resultado ha sido que al someter el producto con hélices pequeñas a tan alta velocidad se ha conseguido el efecto contrario, emulsionando aún más la grasa en el soporte. En condiciones de laboratorio, el uso de poca cantidad de muestra y sin una gran agitación, es difícil simular lo que sucede en producción industrial donde se agitan grandes volúmenes con hélices con una fuerza de cizalla muy alta.

4.1.3. Cambio de orden en la adición de los componentes

Normalmente para la realización de la bebida, primero se disuelven los ingredientes en agua y después se incorporan lentamente a la base láctea. En este caso, sin embargo, se parte de la

base láctea y se van añadiendo los ingredientes en este orden: azúcar, colorante, alcohol, aromas y agua y el pH no es ajustado.

Observaciones a tiempo 0

En el análisis visual inicial se puede observar la **aparición de grasa en forma de cristales** en la



Figura 12 Aparición de grasa en la superficie en la bebida con base de grasa de coco.

superficie. En la bebida SLV2 (base nata) estos cristales son casi imperceptibles, pero en la SLV6 (grasa de coco) se distinguen claramente (Figura 12). Esto se debe a que se disuelven todos los ingredientes en la base láctea en vez de disolverlos previamente en agua, lo que causa un aumento de la concentración de sólidos en la base provocando un desequilibrio en la grasa. A demás se añade el alcohol sobre la base láctea en vez de estar diluido en el agua hecho que provoca la reducción de las cargas estéricas de las caseínas y

su función como emulgente.

Una hipótesis de porque la afectación es mucho mayor en SLV6 podría estar relacionado con la naturaleza de las proteínas y el perfil de ácidos grasos (ver anejos 7.1.). La base láctea de nata contiene, principalmente ácido palmítico y en menor proporción ácido mirístico y oleico. Mientras que la base láctea de grasa de coco tiene un perfil más variado siendo el ácido mayoritario el láurico, seguido del mirístico, y aproximadamente en la misma concentración se encuentra el ácido caprílico, cáprico, palmítico y esteárico.

Los resultados de la distribución de partículas, nos indican que el **tamaño de las partículas ha aumentado considerablemente**, sobretodo en la de grasa de coco (Gráfico 3).

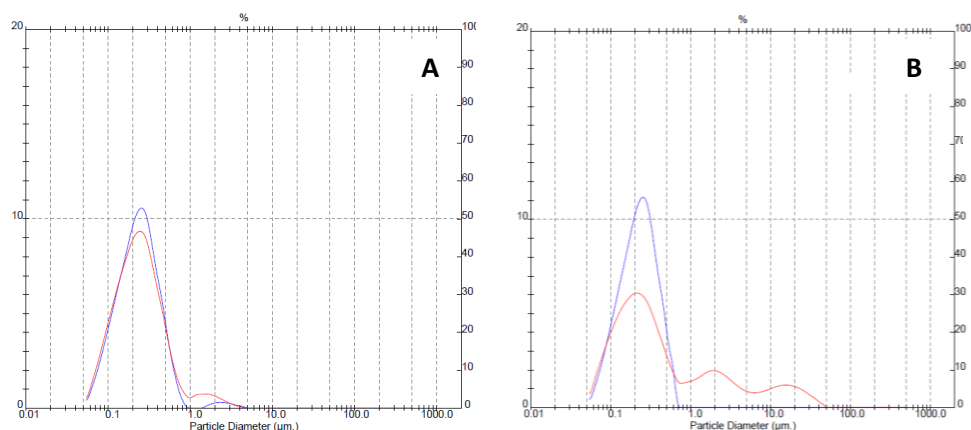


Gráfico 3 (A) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV2 (azul) y el análisis a $t=0$ de la bebida alterada SLV2.3. (rojo) (B) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV6 (azul) y el análisis a $t=0$ de la bebida alterada SLV6.3. (rojo)

Los demás parámetros analizados (pH y densidad) no muestran ningún cambio representativo respecto el patrón (Tabla 11). No se obtiene sedimento de centrifugación en ninguna de las bebidas.

Tabla 11 Efecto de la adición de los componentes en diferente orden sobre la estabilidad de la bebida.

		pH			Densidad rel. a 20°C		
MUESTRAS		t=0	MES 1	MES 2	t=0	MES 1	MES 2
SLV2	PATRÓN	7,07	--	--	1,1002	--	--
	T. AMB	7,02	7,03	6,99	1,1014	1,1028	1,1059
	T. 35°C		6,82	6,90		1,1027	1,1041
SLV6	PATRÓN	7,28	--	--	1,0980	--	--
	T. AMB	6,96	7,01	7,01	1,0961	1,0962	1,0990
	T. 35°C		6,97	6,85		1,0966	1,0971

Observaciones a los 2 meses

Como se puede ver en la Tabla 12, el tamaño de las partículas ha ido disminuyendo con el tiempo, sin presentar diferencias en la evolución entre las bebidas a temperatura ambiente y las de 35°C.

Tabla 12 Evolución del tamaño de las partículas en dos meses de las bebidas SLV2 y SLV6.

Muestras (µm)		t=MES 0	t=MES 1	t=MES 2
SLV2	PATRÓN	0,47		
	T. AMB	0,56	0,57	0,57
	T. 35°C	0,56	0,56	0,58
SLV6	PATRÓN	0,43		
	T. AMB	8,50	2,33	1,91
	T. 35°C	8,50	2,22	2,19

El resto de parámetros que se muestran en la Tabla 11 no presentan variación con respecto al patrón.

Visualmente la bebida con base de grasa de coco a temperatura ambiente muestra el mismo aspecto que a tiempo 0, pero la bebida almacenada a 35°C muestra un aspecto un poco gelatinoso y menos consistente (Figura 13). La bebida con base de nata no presenta grasa en la superficie. En las dos bebidas, indistintamente de la base utilizada y a la temperatura almacenada, se ha producido el fenómeno del desnatado.



Figura 13 Aspecto de la grasa de la bebida en base a grasa de coco a 35°C.

4.2. Efectos de las alteraciones químicas en bebidas alcohólicas con base láctea

4.2.1. Modificación del pH

La bebida es estable a valores de pH entre 6,8-7,2. Para ver el efecto del pH se decide modificar el pH adicionando NaOH al 10% para obtener un pH de 10 o adicionando ácido cítrico al 20% para obtener un pH de 6.

A/ **Aumento de pH** hasta valores de 10.

Observaciones a tiempo 0

No ha producido ningún cambio en la emulsión, observándose solamente un ligero cambio de color. Esto se puede atribuir a que los colorantes utilizados (tartracina, rojo punzo y caramelo) se ven afectados por pHs alcalinos, y también porque hay una modificación de los polifenoles del cacao.

El resto de parámetros evaluados: densidad, distribución de partículas, viscosidad y el sedimento de centrifugación no presentan cambios respecto el patrón.

Observaciones a los dos meses

Como se puede observar en la Figura 14 el pH ha ido disminuyendo con el tiempo, sobretodo el primer mes y más acentuado en las bebidas almacenadas a 35°C. Esto se debe a que las bases lácteas usadas tanto la de grasa de origen animal (nata) como la de origen vegetal (coco) incluyen sales en su formulación que actúan como reguladores del pH. Estas sales actúan con más rapidez a temperaturas altas, por eso las bebidas almacenadas a 35°C tienen una disminución superior del pH (aproximadamente 0,7 unidades de pH) que las conservadas a temperatura ambiente.

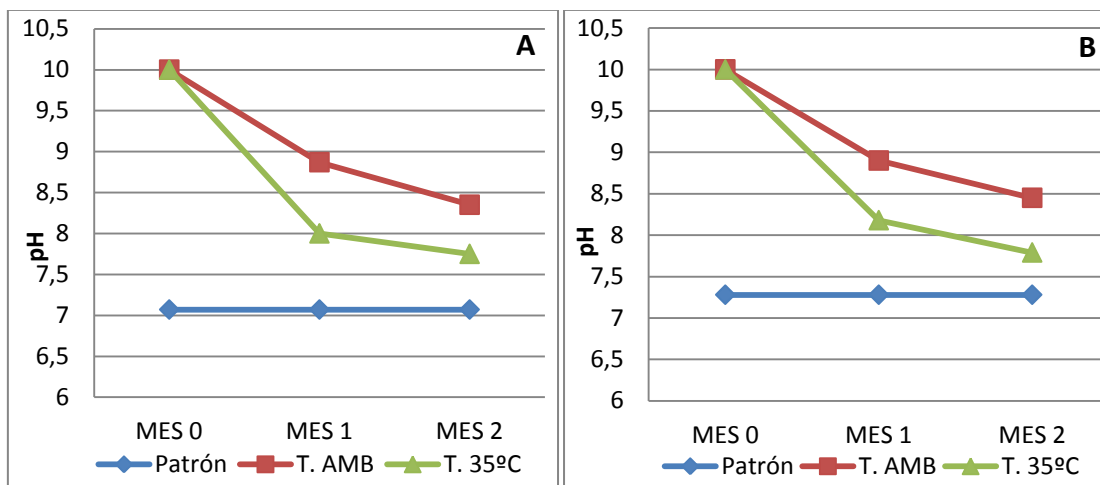


Figura 14 (A) Evolución del pH de SLV2 durante dos meses. (B) Evolución del pH de SLV6 durante dos meses.



Figura 15 Comparación del color entre la bebida SLV2 almacenada a 35°C (izquierda) y la almacenada a temperatura ambiente (derecha).

Las dos bebidas conservadas a 35°C muestran un color más oscuro al final del estudio; atribuible a reacciones de Maillard, ya que es a pHs básicos cuando se ven más favorecidas (pH óptimo entre 9-10) (Figura 15). No se observan modificaciones en los otros parámetros estudiados.

B/ Disminución del pH hasta valores de 6

Observaciones a tiempo 0

La disminución de pH ha producido la formación inmediata de grandes agregados, atribuible a la desnaturalización de las caseínas, ya que al acercarnos al punto isoeléctrico de las caseínas (4,6) se produce una disminución de las cargas de repulsión provocando su agregación. A estos valores de pH, se minimizan los efectos de la repulsión estérica, ya que las caseínas adoptan un estado más recogido (Agboola, S.O. y Dagleish, D.G. 1996). Como consecuencia, las caseínas han dejado de actuar como emulgente ocasionando la separación de la emulsión (Figura 16). La aparición de los primeros agregados es observable a pH 6,6 en las dos bebidas ensayadas.



Figura 16 Separación de la emulsión en dos fases (izquierda) respecto a una bebida no alterada y aspecto de los agregados de la caseína (derecha).

La bebida SLV2 se ve más afectada que la SLV6, la fase acuosa ocupa más espacio y la fase grasa es más compacta. Esto se debe a que la bebida con base de nata tiene más porcentaje de proteínas (caseínas) que la de grasa de coco (Figura 17).

La agregación de la caseína tiene como efecto un aumento considerable del tamaño de las partículas como se puede ver en el Gráfico 4. El tamaño medio de partícula en SLV2 y SLV6 patrón son $0,47\mu\text{m}$ y $0,43\mu\text{m}$ respectivamente, mientras que después de la alteración aumenta a $326\mu\text{m}$ y $303,74\mu\text{m}$ respectivamente.

Observaciones a los dos meses

Como se puede observar en la Figura 18 el aumento del tamaño de partícula se produce durante el primer mes de almacenamiento y es más significativo a temperatura de 35°C . Aunque la evolución es similar en las dos muestras, es en el licor de crema con base nata donde el efecto es más notorio. Al final del segundo mes prácticamente no se observan cambios. El pH ha disminuido durante el primer mes pasando de pH 6 a 5,23 en SLV2 y a 5,72 en SLV6 a causa de la hidrólisis de las sales, no observándose disminución en el último periodo del estudio.



Figura 17 Comparación de las bebidas SLV6 (izquierda) y SLV2 (derecha) almacenadas a 35°C .

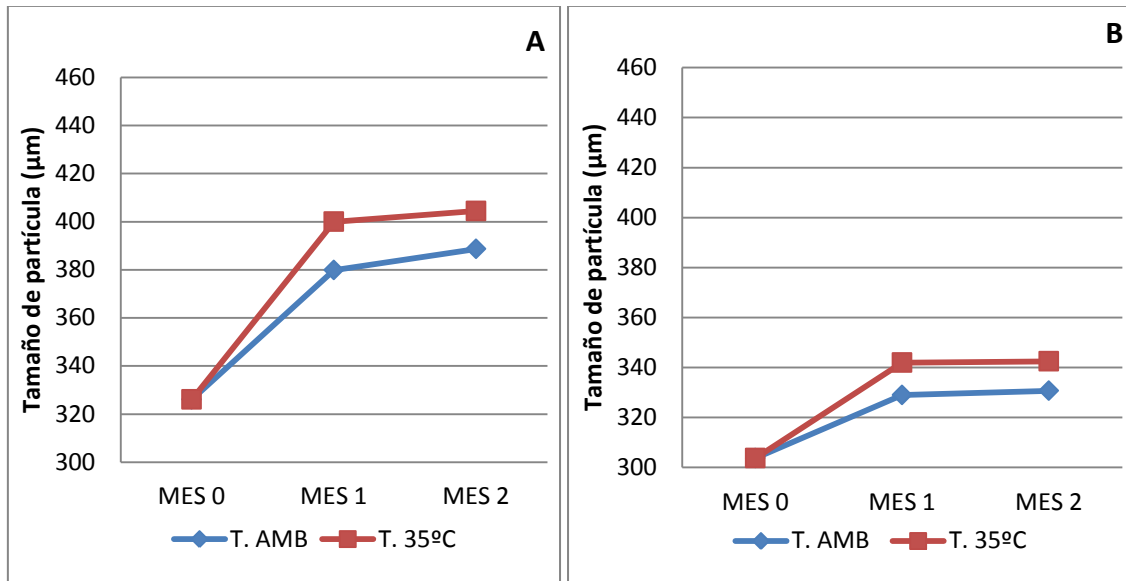


Figura 18 (A) Evolución del tamaño de partícula de SLV2 durante dos meses en la bebida alterada a pH6. (B) Evolución del tamaño de partícula de SLV6 durante dos meses en la bebida alterada a pH6.

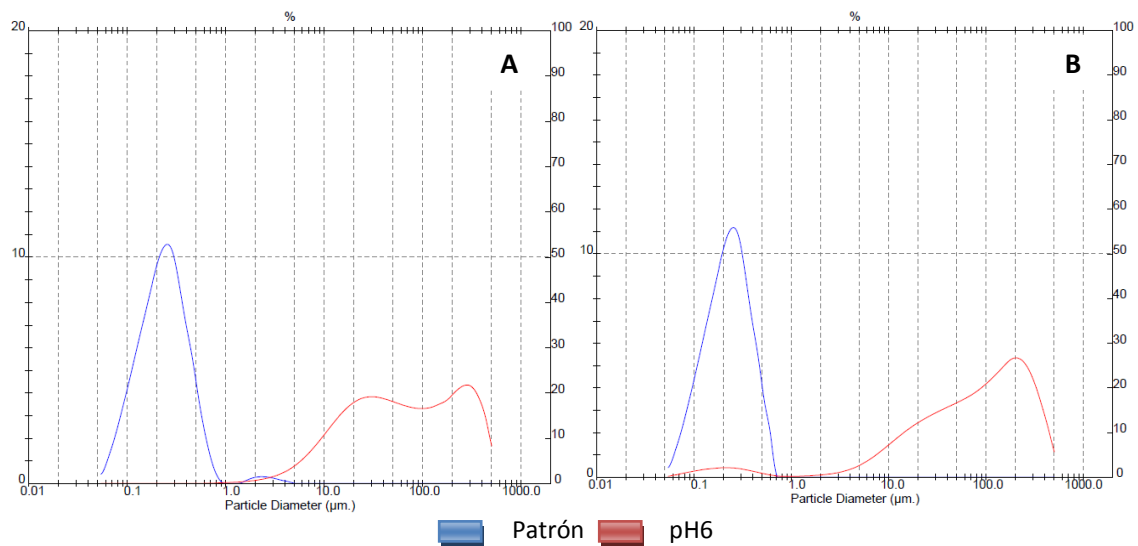


Gráfico 4 (A) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV2 y del análisis a tiempo 0 de la bebida alterada a pH6. (B) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV6 y del análisis a tiempo 0 de la bebida alterada a pH6.

En el estudio del efecto del pH sobre los ácidos y azúcares se puede observar un aumento del ácido cítrico en las bebidas a pH 6, ya que, es el ácido utilizado para disminuir el pH (Tabla 13), sin embargo no se observan cambios notables en el resto de ácidos y azúcares estudiados .

Tabla 13 Efecto de la modificación del pH sobre los azúcares y los ácidos.

	PATRÓN SLV2	pH 10	pH 6	PATRÓN SLV6	pH 10	pH 6
ÁCIDOS (g/L)						
Láctico	0,98	1,02	1,03	---	---	---
Cítrico	1,01	1,15	3,62	0,94	0,94	2,24
AZÚCARES (g/L)						
Sacarosa	219,36	225,11	225,97	220,51	215,20	244,84
Lactosa	3,65	4,71	5,15	---	---	---
Maltosa	2,18	2,45	2,21	4,13	3,43	5,27
Maltotriosa	3,69	3,88	4,69	6,43	5,74	6,16

4.2.2. Aumento del Grado Alcohólico a 20º

El licor de crema suele tener entre 15-17% de alcohol suficiente para inhibir el crecimiento microbiológico, pero un aumento superior a este conlleva la desestabilización de la emulsión. Para dicho estudio se aumenta el grado alcohólico hasta el 20% vol.

Observaciones a tiempo 0

El análisis inicial de SLV2 no muestra ningún cambio representativo en los parámetros controlados respecto el patrón. Sin embargo, en la bebida SLV6 se observa la aparición instantánea de cristales de grasa en la superficie en el momento de la adición del alcohol (Figura 19). Este fenómeno es debido a la coalescencia parcial, idéntico al que sucedía en la adición de los componentes en diferente orden.

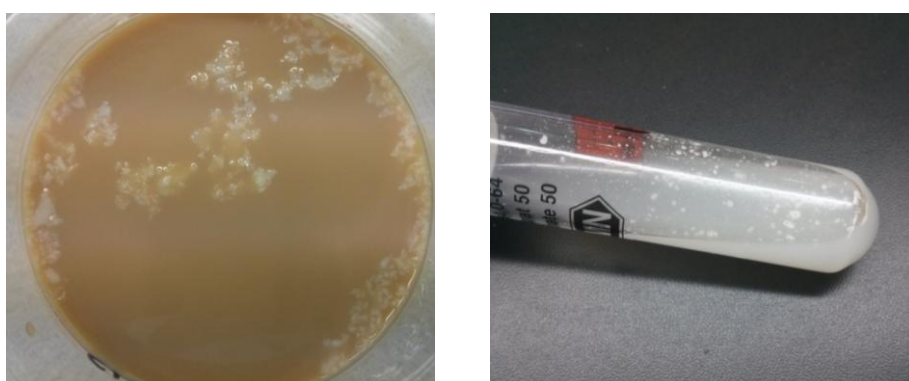


Figura 19 Formación de cristales de grasa en SLV6 (izquierda) y comprobación de la formación de cristales de grasa (derecha).

Existen varias teorías que intentan explicar este fenómeno. Según *Horne D.S. (1992)* la desestabilización de las soluciones con proteínas de la leche esta relacionada con las cargas y

las repulsiones estéricas². Se cree que la presencia de etanol causa un “aplastamiento” de la “capa peluda”³ de las miscelas de caseína causando la reducción de las repulsiones estéricas (Horne D.S. 1984; Dalgleish D.G. 1990) y agregación. Otra causa podría ser que el etanol no es un buen disolvente de las proteínas (Herskovits, T.T.; Gadegbeku, B. y Jaillet, H. 1970) siendo las proteínas vegetales menos insolubles en etanol que las de origen animal. Esto explicaría la alteración de la bebida SLV6.

Este cambio en el aspecto visual también se ve reflejado en el aumento del tamaño de

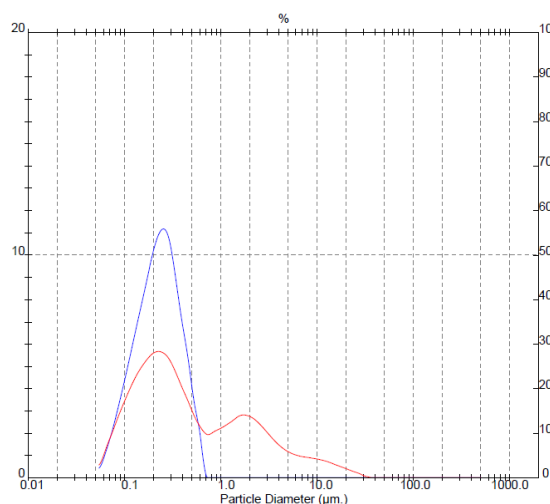


Gráfico 5 Comparación de la distribución del tamaño de partículas del patrón SLV6 (azul) y del análisis a tiempo 0 de la bebida alterada a 20° alcohólicos (rojo).

partículas. Como se observa en el Gráfico 5 el análisis a tiempo 0 de la bebida SLV6 alterada presenta una distribución de partículas poco uniforme, con un tamaño medio de 4,0 µm.

Observaciones a los dos meses

Durante el primer mes el tamaño de partícula disminuye hasta valores de 1,90µm y 1,80µm en las bebidas a temperatura ambiente y a 35°C respectivamente y se mantiene durante el segundo mes.

Como ya había sucedido en las otras alteraciones realizadas y en el patrón, el pH presenta un ligero descenso en el tiempo tanto en SLV2 como en SLV6 y a partir del segundo mes aparece desnatado en la superficie.

² La repulsión estérica es provocada por las cadenas moleculares flexibles (“pelos”) que penetran dentro de la fase continua, como las caseínas. El solapamiento de las capas de pelos provoca un aumento de la concentración de los pelos que sobresalen lo que provoca un aumento de la presión osmótica. El agua se mueve hacia el lugar del solapamiento provocando la repulsión. Esto sólo sucede si la fase continua es un buen disolvente para los pelos, si no lo es, como por ejemplo el etanol, puede dar lugar a la atracción (agregación de las gotitas) (Parkin, K. L.; Fennema, O. R. y Damodaran, S. 2010).

³ Los “pelos” son una cadena de tres carbohidratos con características muy hidrofílicas que tiene la caseína κ. Las submicelas con más caseína κ se sitúan en el exterior de la micela y desempeñan un papel muy importante en la estabilización de la micela, ya que proporciona una superficie inerte a la micela y le confiere estabilidad estérica (Romero del Castillo, R. y Mestres, J. 2004).

4.2.3. Alteración por adición de un exceso de iones Ca^{2+} por el uso de aguas duras

Uno de los principales problemas que presentan este tipo de bebidas es la agregación inducida por el calcio a causa del uso de aguas duras (30-60º Franceses). Para la realización de esta alteración se decide usar agua de red de Sant Feliu de Llobregat con una dureza de 30ºF equivalente a 300mg CaCO_3/L o a 120 mg Ca^{2+}/L . (Ver características del agua en 7.2.)

Después de la realización de la bebida y transcurridos los dos meses no presenta ninguna variación respecto el patrón. El análisis de cationes muestra que el incremento de iones calcio, a pesar de usar aguas duras, ha sido mínimo. Esto se debe a que el agua sólo representa un 18% en la formulación del licor de crema, ya que el ingrediente principal es la base láctea (70%). También hay que tener en cuenta la actuación del hexametáfosfato sódico como secuestrante del Ca^{2+} que evita que se desestabilice la emulsión. Por lo tanto, un agua que tenga un grado de dureza de 30ºF no es suficiente para desestabilizar el licor de crema.

Para comprobar el efecto que hubiera producido dicha desestabilización, se decide proceder a la adición de 1g CaCl_2/L (equivalente a una concentración de 360 ppm Ca^{2+}) a las bebidas almacenadas a temperatura ambiente durante dos meses, obteniéndose unas concentraciones de 520,9 y 413 ppm de Ca^{2+} en SLV2 y SLV6 respectivamente. La adición del CaCl_2 con agitación produce casi instantáneamente agregaciones hasta alcanzar el aspecto que se puede observar en la Figura 20. El nivel de agregación ha sido más elevado en la bebida SLV2 que en SLV6, al igual que en la bebida alterada con la bajada de pH, se debe a que SLV2 (nata) tiene más cantidad de proteínas (caseínas) y mayor concentración de iones Ca^{2+} .

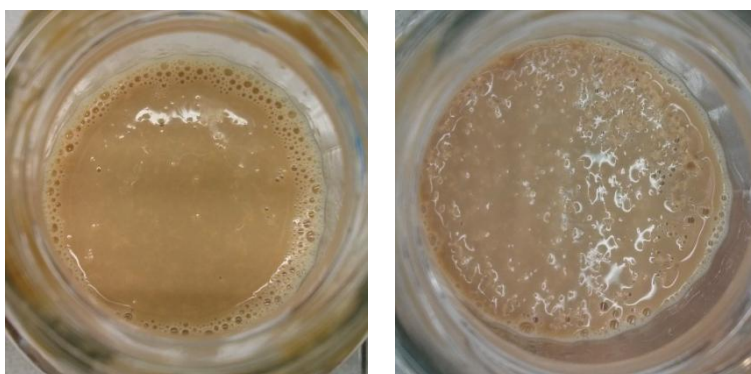


Figura 20 Aspecto de la bebida SLV2 (derecha) y SLV6 (izquierda) alterada con la adición de iones Ca^{2+} .

El pH es ligeramente inferior al patrón, ya que se usaron las bebidas fabricadas con agua de red que habían permanecido dos meses a temperatura ambiente, y la densidad no se ve

modificada con la adición de iones Ca^{2+} (Tabla 14). Como sucedía en la bebida alterada a pH6, la distribución de partículas presenta un perfil muy diferente al patrón debido al aumento del tamaño de partícula (Gráfico 6) provocado por la agregación de estas, pero no se observa la separación de la emulsión en dos fases. La viscosidad aumenta el doble en SLV2 (71 cps) y el triple en SLV6 (91cps).

Tabla 14 Resultados de los parámetros analizados de la bebida con adición de 1g CaCl_2 /L.

	PATRÓN SLV2	SLV2 + Ca^{2+}	PATRÓN SLV6	SLV6 + Ca^{2+}
pH	7,07	6,60	7,28	6,56
Densidad rel. a 20°C	1,1002	1,1005	1,098	1,0974
Dis. Partículas (μm)	0,47	469,67	0,43	489,68
Viscosidad (cps)	36	71	32	91

La adición de iones Ca^{2+} produce la desestabilización del equilibrio entre el fosfato coloidal que liga las caseínas y el fosfato acuoso. Al aumentar los iones Ca^{2+} de la fase acuosa aumenta el fosfato cálcico coloidal provocando la desestabilización micelar a causa de la alta sensibilidad al calcio de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β (Romero del Castillo, R. y Mestres, J. 2004 y Walstra, P. y Jenness, R. 1986).

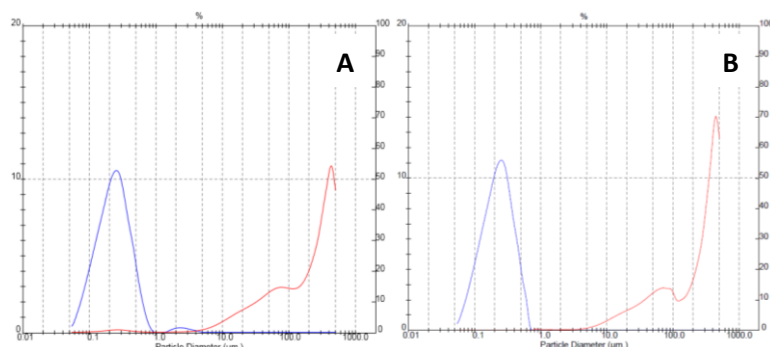


Gráfico 6 (A) (rojo) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV2 y (azul) del análisis a tiempo 0 de la bebida alterada con adición de CaCl_2 . (B) Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV6 y del análisis a tiempo 0 de la bebida alterada con adición de CaCl_2 .

Otro factor importante que aumenta la sensibilidad de las caseínas al calcio es tratamiento con calor que facilita la exposición de las fracciones hidrófobas al solvente (el agua). El cambio de la conformación de la proteína permite que aumente el número de residuos fosforicos disponibles para su interacción con el calcio y se produzca la agregación (Cuomo, F.; Ceglie, A. y Lopez, F. 2011). Este hecho hay que tenerlo en cuenta ya que la posibilidad de que una industria combine una temperatura elevada para facilitar la disolución de los ingredientes y el uso de aguas duras es bastante probable.

4.2.4. Adición de espesantes

La incorporación de un espesante sin un estudio previo para comprobar la compatibilidad con los demás ingredientes puede llevar a la desestabilización de la emulsión. Para este estudio se ha incorporado 9g genupectin /L (E-440), polisacáridos derivados de las paredes celulares de frutas y vegetales, que suele presentar dificultades de disolución en medios alcohólicos.

Observaciones a tiempo 0



Figura 21 Separación provocado por el espesante de SLV2 y SLV6 en este orden

La bebida terminada presenta un color más oscuro y se empieza a separar en dos fases hasta alcanzar la separación máxima a las pocas horas debido a la diferencia de densidades (Figura 21). La separación de fases es un poco mayor en SLV6, pero prácticamente no hay diferencia. Aunque visualmente no hay duda de que se ha producido una alteración, la distribución de

partículas no muestra ningún cambio (Tabla 15). Para comprobar porque sucede esto se decide disolver la misma concentración usada de genupectin (pectina) en agua y

realizarle una distribución de partículas, pero da error. Esto significa que las pectinas se han disuelto en el agua y no influyen en la distribución de partículas. También se realiza una distribución de partículas de la bebida sin homogeneizar (Gráfico 7) y vemos que la parte superior da exactamente igual que el patrón, pero la parte inferior (agua+pectinas) da error.

Tabla 15 Resultados de los parámetros analizados de la bebida con la adición de genupectin (espesante).

	PATRÓN SLV2	SLV2 + espesante t=0	PATRÓN SLV6	SLV6 + espesante t=0
pH	7,07	6,90	7,28	7,24
Densidad rel.a 20°C	1,1002	1,1050	1,0980	1,1002
Dis. Partículas (µm)	0,47	0,45	0,43	0,43
Viscosidad (cps)	36	264	32	149
Sedimento de Centrifugación (%)	0	10-12*	0	23*

*Separación de fases

La viscosidad como era de esperar ha aumentado considerablemente con la adición de un espesante y los demás parámetros no se han visto alterados.

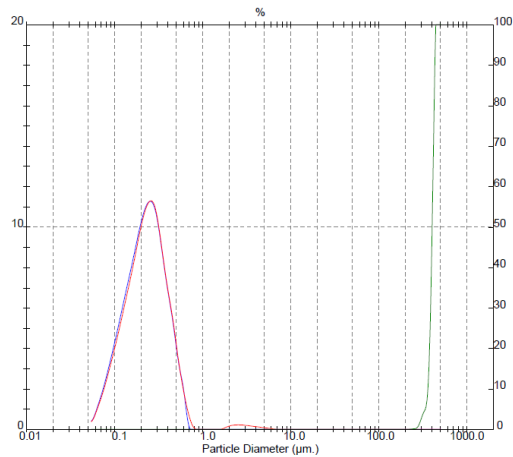


Gráfico 7 Comparación del tamaño de partículas del patrón SLV6 (azul) con la parte superior (rojo) y la parte inferior (verde) de la separación producida por la adición de un espesante.

Observaciones a los 2 meses

El pH presenta una ligera disminución a lo largo del tiempo mientras que el resto de parámetros evaluados no muestran ningún cambio. En este caso se hizo el control a los dos meses, pero a tiempo 0 ya se verifica que no es viable.

4.3. Efectos de la contaminación microbiana en bebidas alcohólicas en base láctea

4.3.1. Contaminación por levaduras, bacterias Psicrófilas o agua alterada

No se ha conseguido romper la emulsión en ninguna de las tres alteraciones microbiológicas y, por lo tanto, los 15º alcohólicos que tienen estos licores de crema son suficiente para inhibir cualquier crecimiento microbiológico que pueda desestabilizar la bebida.

Primero se procedió a la identificación de la levadura que habíamos obtenido de una base láctea sin alcoholizar que se identificó como *Hansenula anomala* con un 88,6% de seguridad (Ver hoja de resultados en Anejos 7.3).

Una vez hecha la inoculación de la levadura en la bebida se realiza el primer control a tiempo 0 y a t= 48 que muestran un crecimiento nulo. Se repiten los ensayos con los mismos resultados. Por tanto, se concluye la inviabilidad de su crecimiento en altas concentraciones de etanol.

El efecto de la inoculación de 5mL/500mL *Pseudomonas fluorescens* y/o el uso de agua muy contaminada con *Pseudomonas fluorescens* y clorada posteriormente para su eliminación buscaban tener la misma repercusión en la bebida. Las bacterias psicotróficas y en especial *P. fluorescens* tienen la capacidad de producir enzimas degradativas, sobre los cuales la cloración es incapaz de inactivar sus efectos. Las proteasas de *P. fluorescens* atacan la κ -caseína para producir para- κ -caseína desestabilizando las micelas de caseína y provocando la coagulación, gelificación y la formación de sabores amargos en el producto (Costa, M.L. et al. 2002).

Igual que en el caso de las levaduras, la inoculación de *P. fluorescens* no presenta ningún crecimiento. Se decide entonces, aumentar la concentración inoculada de *Pseudomonas* a 10mL/500mL y la concentración de la solución basal, pero tampoco se observa crecimiento.

La bebida hecha con agua contaminada se le ha hecho un seguimiento de dos meses y tampoco ha presentado los resultados esperados.

Estos resultados nos indican que la concentración de alcohol (15%) no permite la viabilidad de las levaduras y bacterias estudiadas.

4.4. Tabla resumen de los efectos de las alteraciones físicas, químicas y microbiológicas producidas en bebidas alcohólicas con base láctea

ALTERACIONES	Modificaciones a tiempo=0	Evolución a lo largo de 2 meses	
		Temperatura ambiente (25°C)	Temperatura 35°C
FÍSICAS			
Temperatura	<ul style="list-style-type: none">Reducción del grado alcohólico por efecto de la temperatura.Ligera modificación del color respecto al patrón debido al pardeamiento no enzimático.Incremento relativo de azúcares y ácidos debido a la perdida de volumen, sobretodo el contenido en Sacarosa.	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.
Agitación con rotomix	<ul style="list-style-type: none">Sin efectos observables y/o valorables	<ul style="list-style-type: none">Desnatado	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.
Adición de los componentes en diferente orden	<ul style="list-style-type: none">Aparición de grasa en forma de cristales en la superficie, principalmente en SLV6.Aumento del tamaño de partícula en SLV6(del 8µm	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución del tamaño de partícula de SLV6.	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución del tamaño de partícula de SLV6.
QUÍMICAS			
Modificación a pH 10	<ul style="list-style-type: none">Ligero cambio de color	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución del pH, sobretodo el primer mes (SLV6:10→8,9→8,45 SLV2: 10→8,87→8,35)	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución de pH (SLV6: 10→8,18→7,79 SLV2: 10→8→7,75)Color más oscuro.
Modificación a pH 6	<ul style="list-style-type: none">Formación inmediata de grandes agregados y separación de la emulsión en dos fases.SLV2 más afectada que SLV6.Aumento del tamaño de partícula (SLV2: 326 µm y SLV6: 303,74µm).Aumento del ácido cítrico por adición para disminuir pH.	<ul style="list-style-type: none">Aumento del tamaño de partícula durante el primer mes. SLV2: 379,89µm y SLV6: 328,98µmDisminución del pH (SLV6:6→5,72→5,82 SLV2: 6→5,23→5,31)	<ul style="list-style-type: none">Aumento considerable del tamaño de partícula durante el primer mes, SLV2 448,5µm y SLV6: 341,96µmDisminución del pH. (SLV6:6→5,71→5,71 SLV2: 6→5,27→5,28)

ALTERACIONES	Modificaciones a tiempo=0	Evolución a lo largo de 2 meses	
		Temperatura ambiente	Temperatura 35°C
QUÍMICAS			
Aumento del Grado Alcohólico a 20º	<ul style="list-style-type: none">Aparición de grasa en forma de cristales en la superficie en SLV6 (coalescencia parcial).Aumento del tamaño de partícula de SLV6 (incremento de 3,5 µm).	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución del pH.Disminución del tamaño de partícula (SLV6).	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.Disminución del pH.Disminución del tamaño de partícula (SLV6).
Alteración por adición de iones Ca ²⁺	<ul style="list-style-type: none">Aportación de Ca por agua de red + base (SLV2: 248ppm y SLV6: 72,7ppm)	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.	<ul style="list-style-type: none">Desnatado.
	<ul style="list-style-type: none">Aportación de Ca en forma de CaCl₂ + base (SLV2: 520,9ppm y SLV6: 413ppm)Formación inmediata de grandes agregadosSLV2 más afectada que SLV6.Aumento del tamaño de partícula (SLV2: 469,67µm y SLV6: 489,68µm).	-----	-----
Adición de espesantes	<ul style="list-style-type: none">Oscurecimiento de las muestras SLV2 y SLV6Separación de fases debido a la diferencia de densidades (un poco mayor en SLV6).Aumento de la viscosidad (SLV6:32→149cps, SLV2: 36→264cps)	<ul style="list-style-type: none">Disminución del pH.	<ul style="list-style-type: none">Disminución del pH.Color más claro de la fase de las pectinas + agua.
MICROBIOLÓGICAS			
Contaminación por levaduras, Bacterias Psicrófilas o agua alterada	<ul style="list-style-type: none">No hay crecimiento	<ul style="list-style-type: none">No hay crecimiento	<ul style="list-style-type: none">No hay crecimiento

(---) No realizado por precipitación.

El hecho de utilizar temperaturas elevadas durante el proceso de fabricación comporta un ligero oscurecimiento del licor, un aumento del contenido de azúcar y una ligera disminución del grado alcohólico

La temperatura de almacenamiento (temp ambiente o a 35°C), no implica grandes diferencias de comportamiento sobre la emulsión aunque la base láctea utilizada sea diferente.

La agitación utilizada en condiciones de laboratorio, que es inferior a la del proceso productivo, no tiene repercusiones en la estabilidad de la emulsión.

La modificación de pH solo tiene repercusiones a pH bajos (6), produciendo separación de fases y un aumento del tamaño de partículas en ambas bebidas, siendo su efecto ligeramente superior en SLV2.

El uso de aguas duras no produce efecto sobre la emulsión, sólo se nota su efecto si se sobrepasa una concentración de calcio del orden de 400ppm. Siendo la bebida SLV2 la que presenta una mayor sensibilidad.

El orden de adición de los componentes comporta cambios de concentraciones de los componentes en la solución, lo que implica aparición de cristales en la superficie y aumento del tamaño de partícula debido a fenómenos de coalescencia parcial, especialmente notorios en SLV6. Se producen efectos similares en esta bebida en el aumento del grado alcohólico.

La adición de espesantes comporta un aumento de viscosidad y una separación de fases de la emulsión.

El grado alcohólico de los licores de crema (15º) impide el crecimiento microbiano en cualquiera de los licores ensayados independientemente de la composición de la base láctea utilizada.

5. CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado se pueden sacar las siguientes conclusiones:

La obtención de un patrón de licor de crema en base nata o base grasa de coco ha permitido hacer un control exhaustivo de las alteraciones propuestas en este estudio.

En general, en las condiciones ensayadas en este estudio no se han observado diferencias importantes de comportamiento de la emulsión en función de la base láctea utilizada; base láctea nata (SLV2) o grasa de coco (SLV6), aunque hay que tener en cuenta que:

A tiempo cero

Un error en el orden de adición de los ingredientes durante el proceso de preparación o un aumento del grado alcohólico podría ser el elemento más importante a considerar en el caso de las bebidas lácteas con base grasa de coco (SLV6) ya que se produciría aparición de grasa cristalizada y aumento del tamaño de partícula. Por otra parte, una disminución de pH próxima a 6 podría causar problemas de agregación y aumento del tamaño de partícula. Siendo estos efectos especialmente notorios en las bebidas lácteas con base nata (SLV2).

Si es necesario, la adición de espesantes se tiene que tener en cuenta su compatibilidad con la formulación para evitar separación de fases por diferencia de densidades.

No se observan efectos notorios, por un aumento de temperatura, agitación fuerte o por existencia de cierta contaminación microbiana (efecto del grado alcohólico).

A tiempo de almacenamiento 2 meses

A temperatura ambiente (aprox 20°C) o 35°C (equivalente a 8 meses de vida comercial) las alteraciones aplicadas no tienen efectos notoriamente diferentes de los especificados a tiempo cero en ambas bebidas.

En general, el desnatado y una ligera disminución de pH (que no tiene efectos sobre la emulsión), serían los dos fenómenos más destacables durante este periodo de tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir de forma general que la estabilidad de estos licores depende de una buena homogeneización y del control del pH de la bebida.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agboola, S.O.; Dagleish, D.G. (1996). Effects of pH and ethanol on the kinetics of destabilisation of oil-in-water emulsions containing milk proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72 (4) 448-454
- A.O.A.C. (1984). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 16.064 14th Edition.
- A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 15th Edition, *pág. 891-893 modificado por el Dep. Control de Calidad de Dallant, SA.*
- A.O.A.C. (1993). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist Journal of International vol. 76 nº3 *modificado por el Dep. Control de Calidad de Dallant, SA.*
- Banks, W.; Muir, D.D. (1985). Effect of alcohol content on emulsion stability of cream liqueurs. *Food Chemistry* 18 (2) 139-152.
- Casanova, F.H.; Cardona, T.S. (2004). Emulsiones o/w estabilizadas con caseinato de sodio: Efecto de los iones calcio, concentración de proteína y temperatura. *Vitae (Medellín)*, 11 (1/2), 13-19.
- CeNAN (1982). Técnicas para el Examen Microbiológico de Alimentos y Bebidas. Madrid.
- Cheftel, J.; Besançon, P.; Cheftel, H. (1980-83). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Vol II. cap 4 p. 47-63 Zaragoza: Acribia ISBN 8420005126.
- Cuomo, F.; Ceglie, A.; Lopez, F. (2011). Temperature dependence of calcium and magnesium induced caseinate precipitation in H₂O and D₂O. *Food Chemistry* 126 (1) 8-14.

- Costa, M.L.; Gómez, F.S.; Molina, L.C.; Simpson, R.R.; Romero, A.M. (2002). Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52 (2) 160-166.
- Dalgleish, D.G. (1990). The conformation of proteins on solid/water interfaces-casein and phosvitin on polystyrene lattices. *Colloids Surface* 46, 141-155.
- Escalante, W.E.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Quillama, E.; Hatta, B. (2011). Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. *Revista Peruana de Biología*, 18 (3) 325-334.
- CE. No 110/2008 del Parlamento Europeo y del consejo, de 15 de enero de 2008, relativo a la definición, designación, presentación, etiquetado y protección de la indicación geográfica de bebidas espirituosas. *Diario Oficial*, 13 de febrero de 2008, p.16.
- Herskovits, T.T.; Gadegbeku, B.; Jaillet, H. (1970). On the structural stability and solvent denaturation of proteins I. Denaturation by the alcohols and glycols. *Journal of Biology and Chemistry* 245, 2588-2598.
- Horne, D.S. (1984). Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* 23, 989-993.
- *International Federation of Fruit Juice Producers (1965) I.F.U. nº 30.*
- Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G. (1998). *Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones*. cap 2 p. 37-40 Zaragoza: Acribia ISBN 8420008508.
- Parkin, K. L.; Fennema, O. R.; Damodaran, S. (2010). *Química de los alimentos*. 3a ed. cap 13, cap 15 Zaragoza: Acribia ISBN 9788420011424.
- Romero del castillo, R.; Mestres, J. (2004). *Productos lácteos tecnología*. cap 1 p. 26-30 Barcelona: Edicions UPC ISBN 8483017458.
- Instituto Nacional de Racionalización y Normalización (1975) I.R.A.N.O.R. UNE 33-112-75.

- Varnam, A.H.; Sutherland, J.P. (1996). *Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología*. cap 9 p. 417-451 Zaragoza: Acribia ISBN 8420008265.
- Walstra, P.; Jenness, R. (1986) *Química y física lactológica*. cap 6 p. 94-99, cap 13 p. 203-210 Zaragoza: Acribia ISBN 8420005940.

Recursos electrónicos

- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Información económica sobre la industria agroalimentaria. *Informe industria alimentaria 2011-2012*. [en línea]. [Consulta: 15 junio 2013]. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/informacion-economica-sobre-la-industria-agroalimentaria/>
- Generalitat de Catalunya. Estadístiques i observatoris. Indústria agroalimentària. A: Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. *Informe de la indústria, la distribució i el consum agroalimentaris a Catalunya*. [en línea]. Barcelona: Servei d'Indústries i Comercialització Agroalimentàries, 2009 [Consulta: 15 junio 2013]. Disponible en: <http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR/menuitem.3645c709047c363053b88e10b031e1a0/?vgnextoid=85e09650e26b3310VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnextchannel=85e09650e26b3310VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnextfmt=default>
- Federación Española de Bebidas Espirituosas. *Bebidas espirituosas* [en línea]. [Consulta: 19 julio 2013]. Disponible en <http://www.febe.es/contenidos/bebidas/>
- Scribd. *Emulsiones*. [en línea]. [Consulta: 6 septiembre 2013]. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/19447454/Emulsiones>
- Ministerio de la Presidencia. *Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1416/1982 Reglamento Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguardientes compuestos, licores, aperitivos sin vino base y otras bebidas derivadas de alcoholes naturales* [en línea]. [Consulta: 6 septiembre 2013]. Disponible en <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1982-16226>

7. ANEJOS

7.1. Perfiles de los ácidos grasos de las bases

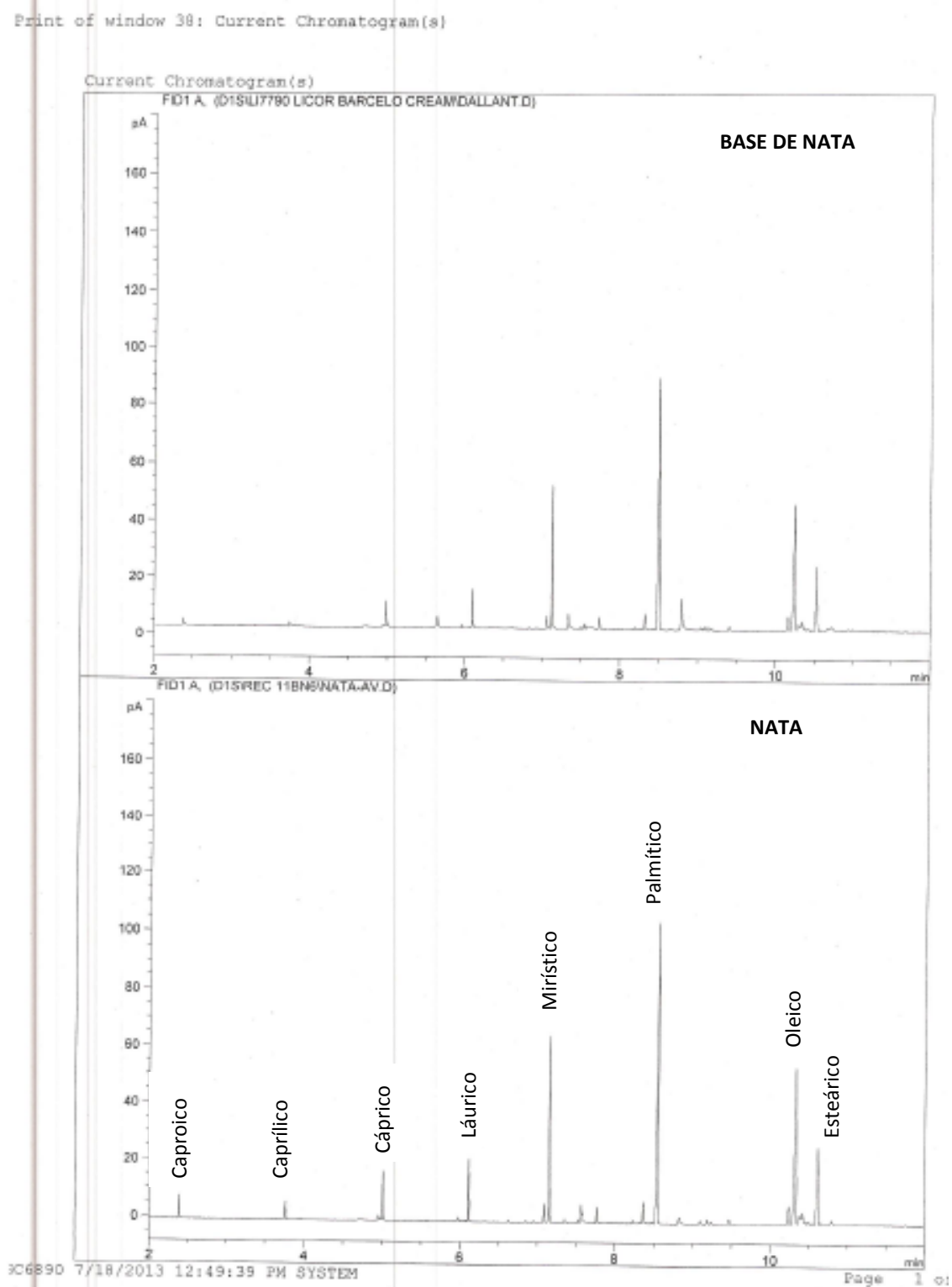


Figura 22 Perfil de los ácidos grasos de la base de nata.

Int of window 38: Current Chromatogram(s)

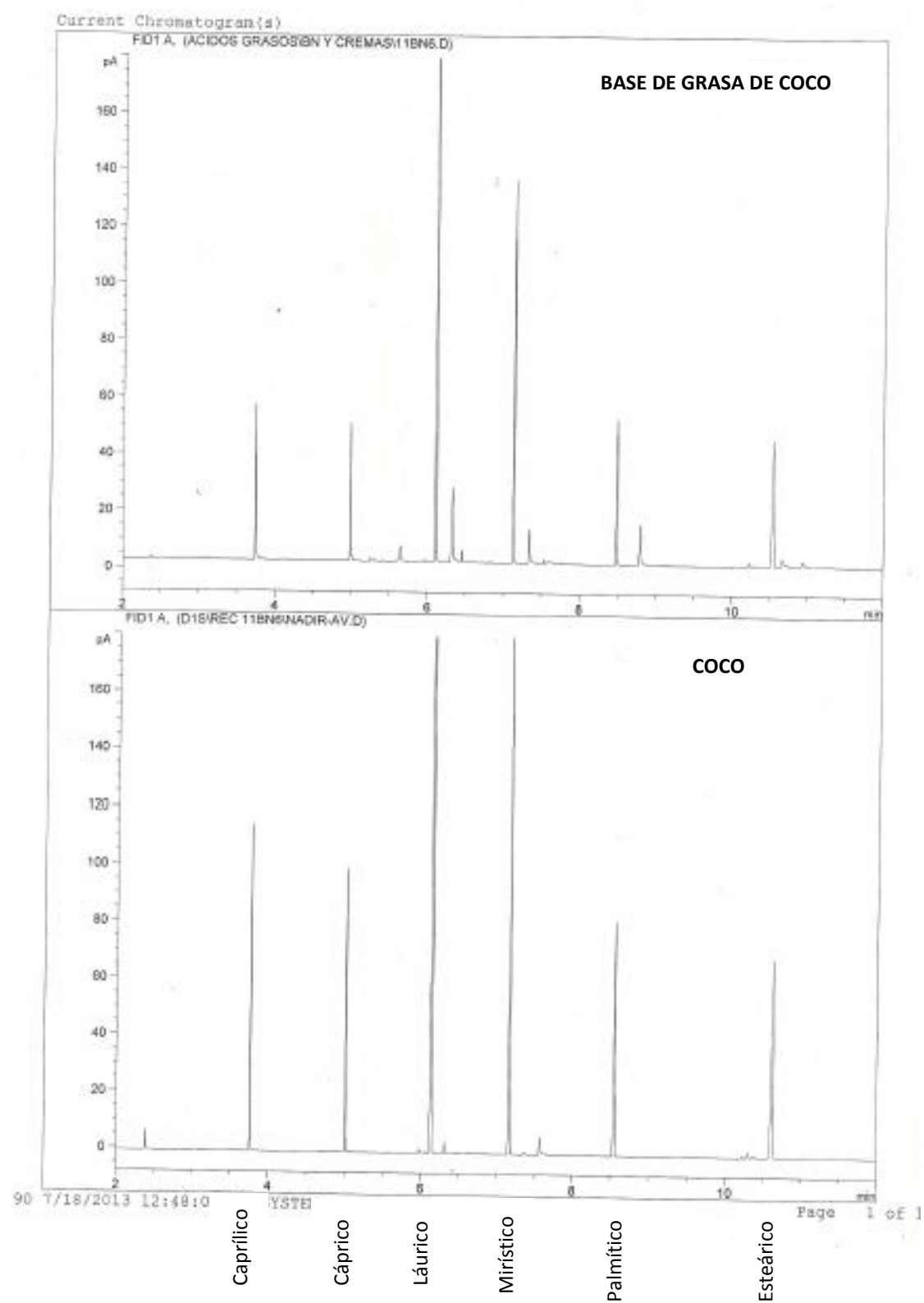


Figura 23 Perfil de los ácidos grasos de la base de grasa de coco.

7.2. Características del agua de red y del agua de osmosis.

Tabla 16 Características del agua de red y del agua de osmosis utilizada en la fabricación del licor de crema.

	Agua de red	Agua de osmosis	Método
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	936	0,8	
Dureza ($^{\circ}\text{F}$)	30	0	Aquadur test tiras
Hierro (mg/L)	0,40	---	Test hierro Met. colorimétrico
pH	7,62	5,4	
Amonio (mg/L)	0,06	0,04	Test 0-03 Nanocolor Ammonium 3 de Macherey-Nagel
Cloruros (mg/L)	134	7	Test 0-19 Nanocolor Chlorid 200 de Macherey-Nagel
Nitritos (mg/L)	0,016	0,015	Test 0-68 Nanocolor Nitrit 2 de Macherey- Nagel
Nitratos (mg/L)	3,30	1,10	Test 0-64 Nitrat 50
Sulfatos (mg/L)	119	35	Test 0-86 Sulfat 200

